

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PIERRE MASSON

(1880-1959)

La carrière de Pierre Masson débute en 1907, lorsque, venu de Bourgogne, il entre à l'Institut Pasteur dans le laboratoire de Borrel, qui dirigeait alors le Cours de Microbiologie. Pierre Masson pense y étudier le « Problème du Cancer » mais, d'emblée, la diversité des tumeurs et les variations de leur aspect au microscope l'attirent davantage ; il en recherche les origines ailleurs que dans une cause microbienne.

Auprès de Borrel, il trouvait un groupe de jeunes chercheurs : E. Pinoy, E. Burnet, L. Nègre et plus tard J. Magrou. A. Peyron, sans être directement dans leur équipe, avait de fréquents contacts avec eux et déjà majestueux, hors des proportions et des préoccupations moyennes des humains, il avait l'esprit accaparé par l'embryogénèse des tumeurs de l'homme et des animaux. Jusqu'à sa mort, il devait rester attaché à cette question.

En 1956, lors d'une de ses dernières visites à l'Institut Pasteur, P. Masson a rappelé cette époque et spécialement une fin d'après-midi où son collègue Peyron, arrivant au laboratoire en jaquette, haut-de-forme, un bouquet de fleurs à la main, annonce qu'il doit se fiancer le soir même. Mais le lendemain il arrive tard, reste sombre et finit par avouer qu'il n'a pas été au dîner de fiançailles et qu'il ne voulait être gêné dans sa recherche par aucun lien.

Dans la grande pièce du Cours de Microbiologie de l'aile opposée à celle de la Rage, les bocaux de tumeurs, les souris cancéreuses, l'élevage des vers à soie, l'incubateur à œufs, les cerveaux d'hommes morts de méningite tuberculeuse et le ballon de verre à fond plat tournant sur un disque vertical et dans lequel dansaient les billes de verre pour broyer les bacilles tuberculeux, étaient les témoins de la diversité des recherches de Borrel. Pour quelle question ne se passionnait-il pas ?

La guerre de 1914 a séparé tous ces hommes et à partir de 1919 ce laboratoire allait être animé par l'esprit de sagesse et de méthode de J. Dumas.

C'est en 1919, juste un siècle après la fondation par Lobstein à Strasbourg, de la première chaire d'Anatomie pathologique qui ait jamais été fondée dans une Faculté de Médecine, que Pierre Masson y vient enseigner. Il arrive en même temps que Borrel, nommé Directeur de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université et qui, à ce titre, va être chargé de l'enseignement de la Microbiologie à la Faculté de Médecine.

Nul ne paraissait mieux désigné que Pierre Masson pour apporter à Strasbourg le sens de la clarté et la rigueur technique de l'histo-pathologie française et pour y succéder au célèbre anatomo-pathologiste qu'avait été von Recklinghausen.

En peu d'années, l'Institut de Pathologie de Strasbourg devient, sous son impulsion, un très grand centre d'anatomie pathologique. Il suffit d'en citer les élèves : Charles Oberling, Frédéric Martin, Jean-Louis Nicod, Jean Bablet, reparti rapidement outre-mer où il a créé des laboratoires d'histo-pathologie dans les Instituts Pasteur hors de France, et surtout Louis Géry, pasteurien également, qui a succédé à P. Masson. Louis Fruhling maintient maintenant la tradition.

Il nous reste, dans la leçon inaugurale de Charles Oberling, un témoignage de ce qu'était la vie des laboratoires de cet Institut : « ... nous partagions tout notre temps entre la salle d'autopsie, le laboratoire et la bibliothèque. Notre Maître, jeune encore, et plein d'enthousiasme, était constamment à nos côtés, détournant nos esprits de la fièvre trop livresque du savoir, il nous ramenait sans cesse à l'observation des faits tels qu'ils se présentent dans la nature... »

Malheureusement devant certaines difficultés, peu de temps avant la deuxième guerre mondiale, P. Masson quitte la vieille Europe et refait école au Canada dans la chaire d'anatomie pathologique de Montréal. Là, il recommence sa tâche, forme à nouveau des élèves, devient le maître des anatomo-pathologistes canadiens qu'il a formés jusqu'à sa retraite, comme il avait formé ses élèves de Strasbourg.

Séparés de lui pendant cette seconde guerre ses collègues de l'Institut Pasteur le voient revenir avec joie, pour de brefs séjours ; il vient chaque année retrouver ses deux fils et sa fille qui, plus tard, le rejoignent au Canada.

En 1943, durant l'occupation, il avait été élu Membre de l'Académie Nationale de Médecine.



Pendant ces trois étapes de son existence, avec une continuité rare, P. Masson a mené l'œuvre qui a fait de lui l'un des plus grands maîtres de l'anatomie pathologique française.

C'est en histologiste et en technicien qu'il raisonne. Pour ses interprétations, il donne la primauté aux modifications de structure, à l'observation des cellules ou des substances intercellulaires, aux variations d'affinité tinctoriale ou de nature chimique des divers éléments qui constituent les tumeurs. Mais il pense qu'il faut toujours respecter la clinique, ne jamais répondre sur l'histologie seule en cas de doute.

Bien que son activité principale soit consacrée aux tumeurs, il ne reste pas spécialisé à cette branche de la médecine. Pour mieux intégrer les processus tumoraux dans le cadre de la biologie générale, il les compare aux diverses inflammations et constate avec précision que : dysgénésie et tumeurs dysgénétiques, hyperplasie et tumeurs hyperplasiques, néoplasies et néoplasmes restent des distinctions encore moins aisées à définir au fur et à mesure que l'on progresse dans leur connaissance.

Pour l'étude analytique des divers types de tumeurs, P. Masson fait constamment œuvre personnelle. Il abandonne la classification en usage pour grouper les tumeurs autour des lignées embryonnaires et des dérivés normaux dont elles proviennent. Il ne se rallie jamais entièrement à la théorie embryonnaire ou dysembryoplasique des tumeurs, mais la considère comme étant vraie pour un certain nombre d'entre elles. La cancérologie expérimentale est restée en accord avec ses constatations. Sur la fin de sa vie il se rapproche de la théorie virale du cancer au moment où il écrit : « La théorie irritative du cancer nous a conduits à une impasse. La théorie des virus cancérogènes, à peine exploitée, nous ouvre une voie pleine de promesses. »

Un souci permanent de la technique, allié à une remarquable habileté manuelle, l'ont constamment aidé dans son travail. « La bonne technique est indispensable à la bonne histologie. »

Et Pierre Masson craignait avant tout le risque pour beaucoup de laboratoires d'histopathologie d'être débordés par le nombre des coupes qui affluent. « Bref, l'abondance de matériel interdit ou entrave le travail vraiment scientifique. »

Tout histologiste, même très averti, doit méditer le chapitre de son Traité où les écueils, les imperfections, les causes d'erreurs de la technique sont exposés avec une extrême simplicité.

Ce traité des *Tumeurs humaines*, qui constitue la somme de ses travaux, est maintenant consulté par tous les anatomo-pathologistes ; écrit dans un style direct, personnel, il reflète le caractère à la fois imaginatif et concret de son auteur.

Évoquer le caractère de P. Masson est chose presque impossible, sa sensibilité, bien connue, nous l'interdit encore. Le souci constant de vérité lui faisait garder une simplicité d'attitude dans laquelle éclatait, même à un âge avancé, une faculté d'étonnement devant la nature et une fraîcheur de cœur qui ne sont d'habitude que l'apanage de la jeunesse.

Bien que Pierre Masson ait quitté l'Institut Pasteur depuis déjà quarante ans, il fait encore partie de ceux dont le souvenir nous reste, non pour nous faire un rempart de leur notoriété, mais pour essayer d'être dignes d'eux et de garder l'esprit de notre fondateur et de ses disciples.

Que Madame Masson et ses trois enfants reçoivent l'expression des condoléances les plus vives que leur adresse l'Institut Pasteur.

J. C. L.

REMARQUES SUR LES CARACTÉRISTIQUES DE LA PARTICULE VIRALE INFECTIEUSE (*)

par A. LWOFF, T. F. ANDERSON et F. JACOB (**).

*(Institut Pasteur, Paris,
et Institute for Cancer Research, Philadelphia)*

L'unité infectieuse d'un virus est un système organisé comprenant deux types d'espèces moléculaires. L'une, génétique, contient l'information nécessaire pour la production de l'autre qui, à son tour, est essentielle pour l'expression de la nature virale du système. Les interrelations dans le temps et l'espace des deux espèces moléculaires sont telles qu'aucune ne peut être considérée à l'exclusion de l'autre. L'une et l'autre espèce sont synthétisées durant la phase végétative ; l'une et l'autre espèce s'unissent pour constituer la particule infectieuse. Toute composante virale particulière pose nécessairement le problème du tout.

Nous nous proposons de discuter ici certains types d'organisation et de structure qui semblent bien être des éléments constants et caractéristiques de la particule infectieuse virale et plus particulièrement de son constituant non génétique. Nous serons ainsi conduits à préciser certaines notions et, par voie de conséquence, à introduire quelques termes nouveaux. L'usage du mot virus est justifié du fait que ce terme désigne une catégorie particulière d'entités infectieuses. La terminologie que nous proposons sera justifiée si, conformément à nos conclusions, la particule virale, dans sa totalité comme dans ses parties, représente bien un type spécifique de structure. Il nous paraît nécessaire, avant d'aborder le sujet, de rappeler quelques notions générales sur les virus.

(*) Les discussions qui ont conduit à la rédaction de ce mémoire ont commencé lorsque l'un de nous (T. F. Anderson) bénéficiait d'une bourse de la Fondation Fulbright, de la Fondation John Simon Guggenheim, puis d'une bourse de la National Science Foundation.

(**) Manuscrit reçu le 25 mai 1959.

REMARQUES SUR LES VIRUS.

Les virus représentent une catégorie spécifique d'entités infectieuses strictement parasites qui existent sous trois formes : infectieuse, provirale et végétative. Une entité ne peut être considérée comme virale que si l'on a pu reconnaître dans son cycle l'existence d'un élément infectieux complexe et organisé ; complexe en ce qu'il possède deux composantes, l'une génétique, l'autre non ; organisé en ce que les relations spatiales des deux composantes sont définies et constantes. La particule infectieuse est dépourvue d'un système autonome d'enzymes produisant les liaisons à haut potentiel chimique nécessaires à la synthèse de ses matériaux de construction. Elle est métaboliquement inerte et incapable de croître et de se diviser, c'est-à-dire incapable de se multiplier. Le matériel génétique participe de l'inertie métabolique générale de la particule infectieuse. Il est constitué d'un seul acide nucléique, soit ribo-, soit désoxyribonucléique.

On sait que les virus sont reproduits à partir de leur seul matériel génétique [1, 2, 3]. Une infection virale peut être considérée comme l'introduction dans une cellule ou un organisme d'un matériel génétique capable de se multiplier, de provoquer une maladie et de reproduire des particules infectieuses organisées [4]. Toute entité infectieuse complexe organisée reproduite à partir de son seul matériel génétique est nécessairement virale. Inversement, tout matériel génétique capable de donner naissance à une entité infectieuse complexe organisée est viral [5].

L'analyse physiologique des mutants défectifs des bactériophages tempérés révèle que la production de particules virales exige l'exercice d'au moins deux catégories de fonctions gouvernées par le génome viral [6]. L'une permet au matériel génétique viral d'échapper au système de coordination de la cellule hôte ; il se multiplie alors de façon autonome, utilisant les systèmes enzymatiques de l'hôte qui produit des liaisons à haute énergie et synthétise les matériaux nécessaires à sa reproduction. L'autre assure la synthèse des composantes virales non génétiques. Composantes génétiques et non génétiques sont finalement organisées en particules infectieuses. Dire qu'un matériel génétique viral doit porter l'information pour la production d'un système organisé infectieux pourra sembler un truisme. C'est ce truisme que nous nous proposons d'analyser.

HISTORIQUE.

Dans leur mémoire classique *Etudes cristallographiques sur les virus des plantes*, Bernal et Fankuchen [7] ont conclu qu'une particule infectieuse du virus de la mosaïque du tabac « ... is more

analogous to a protein crystal than to a protein molecule. Its internal regularity is very considerable »... « The smallest subunits are lined up in an orderly array and the repeat pattern is different from that of any protein studied so far »... « The crystallinity of the virus goes further than the aggregation of similar particles that produce the visible crystals or liquid crystals, it is a property of the isolated particles of the virus »... « The evidence supports the view that the virus particle is in some sense intermediary between a molecule and a crystal of a normal crystalline protein ».

Quelques années plus tard, Schramm [8] réussit à séparer les sous-unités, puis à les unir à nouveau. Schramm conclut que « ...die Molekülform des Virus vor andern möglichen Anordnungen der Untereinheiten energetisch bevorzugt ist ». Ceci est donné comme un exemple d'« auswählende Polymerization », et l'auteur insiste sur la rareté de ce processus. D'après Schramm, la forme des protéines virales de haut poids moléculaire est déterminée par la structure des sous-unités qui jouent un rôle déterminant dans des fonctions biologiques du virus.

Dans une revue consacrée à l'analyse aux rayons X et à la structure des protéines, Dorothy Crowfoot Hodgkin [9] discute de la structure du virus du rabougrissement buissonneux et conclut : « if the symmetry is genuinely cubic, two alternative conclusions are possible; the molecule may be oriented statistically in all directions to simulate spherical symmetry, or it may consist of 12 submolecules... The simplest kind of structure that could be devised is one of 12 spheres of radius 45 Å arranged in cubic close packing. »

Caspar [10] aboutit à la même conclusion : l'enveloppe protéinique du virus du rabougrissement buissonneux est formée de sous-unités. Leur nombre est un multiple de 12 et probablement de 60. Les données chimiques suggèrent un nombre voisin de 300. Le poids moléculaire des sous-unités est voisin de 125 000, peut-être inférieur, le minimum étant 25 à 28 000.

Sur la base de considérations théoriques, il a été également suggéré par Crick et Watson [11, 12] que la fraction protéique des particules virales devait être constituée de sous-unités. On admet aujourd'hui qu'un segment d'acide nucléique déterminé porte l'information pour l'organisation d'une protéine d'un poids moléculaire déterminé. Le calcul montre que l'acide nucléique des petits virus, comme par exemple celui de la poliomyélite, ne peut gouverner la formation que d'une protéine de poids moléculaire relativement faible, correspondant à une fraction seulement des protéines de l'enveloppe. L'enveloppe n'est pas, par conséquent, une « molécule » unique. D'après Crick et Watson, la fraction protéinique d'un virus sphérique serait une coque constituée d'un

grand nombre de molécules protéiques identiques, assemblées de façon régulière. « The preferred arrangements will be one in which every subunit has the same environment as every other subunit. This can be done only if the subunits are related by symmetry elements. » Un virus possédant une symétrie cubique est nécessairement formé par l'agrégation d'unités plus petites et asymétriques. Dans un virus sphérique, l'acide ribonucléique aurait aussi une symétrie cubique qui résulterait du mode de pliage de la fibre d'acide nucléique [11, 12].

LE SYSTÈME INFECTIEUX VIRAL.

Powell [13] a défini un type de combinaison structurale formé de deux espèces moléculaires dont l'une enveloppe l'autre. La solidité des liens unissant les molécules de la « cage » assure l'emprisonnement de la composante interne. Les deux substances restent ainsi associées. Le terme « clathrate » a été proposé par Powell pour ce type de complexe. D'après Pirie [14], la particule infectieuse du virus de la mosaïque du tabac pourrait être un composé du type « clathrate » dont l'acide nucléique, et peut-être la protéine, seraient maintenus par des forces purement mécaniques. Il semble évident que la structure des petits virus étudiés correspond à la définition générale des « clathrates ». La particule infectieuse est un système complexe dans lequel la composante interne, le matériel génétique, est emprisonnée dans une structure externe, la coque.

La coque de la plupart des virus est formée par une couche unique de sous-unités. L'asymétrie des sous-unités doit être telle qu'elles ne peuvent s'assembler que d'une seule manière. Une « face » d'une sous-unité a une affinité pour la partie complémentaire d'une autre. Peut-être la face interne a-t-elle une affinité pour l'acide nucléique. Si des liaisons pouvaient être formées entre des faces quelconques, les sous-unités pourraient cristalliser ou former des agrégats à l'intérieur de la cellule-hôte. Si tel était le cas, un certain nombre de sous-unités seraient probablement perdues en tant que parties formatives des particules infectieuses.

Ainsi que le notait Powell, pour qu'une molécule soit emprisonnée, il faut qu'elle soit à la bonne place lorsque la cage se forme. Une fois la cage constituée, il est aussi difficile pour une molécule d'y pénétrer que d'en sortir. Le « clathrate » est formé par l'assemblage de composés enveloppants autour du composé enveloppé. La cage est formée progressivement à partir d'une solution contenant les deux espèces moléculaires à concentration élevée. Cette description de Powell s'applique à la morphogénèse d'un virus, lequel, selon l'hypothèse de Crick et Watson (1957),

est formé peu à peu de sous-unités enfermant le matériel génétique. La particule infectieuse virale est un système clos dans lequel le matériel génétique du virus est enfermé dans une coque. Il est difficile d'imaginer que la formation d'une particule infectieuse virale puisse consister en la pénétration du matériel génétique dans une coque préformée. Ainsi que le suggèrent en particulier les observations de Kellenberger [15], la particule virale doit résulter de la condensation de l'acide nucléique suivie de l'assemblage de sous-unités autour du matériel génétique dûment plié. Ce processus, souvent appelé maturation, est en fait l'assemblage régulier de sous-unités autour du matériel génétique viral. Comme l'ont noté Crick et Watson, il n'est nullement nécessaire que les sous-unités appartiennent à une seule espèce moléculaire.

Ainsi, les systèmes infectieux viraux possèdent la structure et le mode de formation des « clathrates ». La coque des petits virus à symétrie cubique ou hélicoïdale étant formée par un nombre défini de sous-unités, rangées dans un ordre déterminé, l'unité virale infectieuse a nécessairement une taille et une forme définies.

L'ORIGINALITÉ DE LA COQUE VIRALE.

L'enveloppe de la particule virale infectieuse est formée de sous-unités de structure spécifique. Ce type de structure est-il exclusivement viral ou bien existe-t-il chez certains organites cellulaires ?

L'arrangement spatial de sous-unités n'est pas, d'après Crick et Watson (1957) particulier aux virus, mais existerait chaque fois, qu'au niveau moléculaire, une structure de taille et de forme définies est construite à partir d'unités plus petites. Ceci implique l'existence d'un motif répété (repeat pattern) et les sous-unités doivent avoir des relations de symétrie.

Une hypothèse a été proposée par Crick et Watson selon laquelle les particules microsomales sont formées de sous-unités et possèdent une symétrie cubique. Nos connaissances concernant la spécificité, la taille, la forme et l'organisation de ces particules sont, pour le moment, plutôt vagues. Cependant, en raison même de l'hypothèse de Crick et Watson, la question d'une analogie de structure entre particules microsomales et particules virales infectieuses doit être discutée. Si les particules microsomales étaient construites comme des virus, leur acide nucléique, replié et protégé, serait métaboliquement inerte, à moins que leur enveloppe ne soit perméable. Les sous-unités des particules microsomales, si elles existent, ne sont donc probablement pas organisées comme les sous-unités d'une coque virale. Ceci peut être attribué à une différence de structure entre les sous-unités des uns et des autres.

La coque des virus à symétrie cubique ou hélicoïdale étant construite de sous-unités, il en résulte que le génome des virus corres-

pondants doit contenir l'information pour la structure de ces sous-unités. Ce type d'information spécifiquement viral est-il présent dans tous les virus ? Il est évidemment possible que la symétrie cubique ou hélicoïdale ne soit pas un trait général des virus. Ce qui semble général, cependant, c'est l'anatomie du système infectieux, le fait que le matériel génétique viral est enfermé dans une coque étanche. L'hypothèse semble plausible que toutes les coques virales sont formées de sous-unités. Si tel était le cas, l'organisation de la coque dépendrait en dernière analyse de la structure de ses sous-unités, et le matériel génétique viral devrait nécessairement porter l'information spécifique pour la structure de ces sous-unités. C'est bien ce que confirme l'analyse génétique [16].

TERMINOLOGIE.

La particule infectieuse organisée qui fait partie intégrante du cycle de tout virus est appelée différemment suivant les auteurs et les circonstances. On l'appelle particule, particule infectieuse, système infectieux, particule virale, ou simplement virus. Aucune de ces désignations n'est satisfaisante. Quelques-unes sont trop longues, la signification des autres dépend du contexte. « Particule » ne peut être tenu pour synonyme de particule infectieuse d'un virus. De même, virus désigne parfois la particule infectieuse, parfois le matériel génétique du virus, parfois une entité appartenant à la catégorie virus. La phrase « une cellule produit une centaine de virus » peut vouloir dire, ou bien que la cellule produit une centaine d'espèces de virus, ou bien cent particules d'une espèce donnée de virus.

Beard [17] a proposé d'attribuer un nom distinctif à la particule infectieuse virale et a proposé « viricule » qui veut dire petit virus et n'est, par conséquent, pas satisfaisant. Nous proposons « virion », unité de virus, qui peut être utilisé aussi bien dans les langues latines qu'anglo-saxonnes (prononciation anglaise vir'i-on).

ANATOMIE DU VIRION. — Dans tous les cas, le virion est essentiellement constitué par une coque, principalement protéinique, enfermant le matériel génétique. Cette coque est, suivant les auteurs, appelée composant protéinique, ou coque, ou enveloppe. Nous proposons de l'appeler capside (du grec *Καψα*, boîte). La capside est construite de matériaux qui sont appelés suivant les auteurs unités ou sous-unités et même parfois « sous-molécules ». Dans un but d'unification, les sous-unités seront appelées capsomères (de *Καψα*, boîte, et de *μερος*, partie ; parties de la boîte). Lorsque le matériel génétique du virus est enfermé dans la capside, le résultat est un virion.

LES VIRIONS ET L'ÉTAT CRISTALLIN. ENCAPSIDATION ET DÉCAPSIDATION.

Bernal et Fankuchen [7] ont considéré les virus comme intermédiaires entre molécules et cristaux. Un cristal résulte de l'arrangement régulier de ses constituants. La maille d'un cristal est formée d'un nombre défini de molécules et elle est symétrique. La taille d'un cristal n'est pas limitée, au moins théoriquement. Considérons maintenant un virion de forme polyédrique. Le virion polyédrique de la poliomyélite, par exemple, peut former des cristaux et la taille du cristal viral, comme celle de tout autre cristal, n'est pas limitée.

Le virion, comme la maille cristalline d'un cristal « ordinaire », est symétrique. Il y a cependant une différence importante entre un cristal de protéine, par exemple un cristal d'enzyme, et la capside d'un virion. Un cristal d'enzyme est soluble dans une solution aqueuse d'électrolytes : les liens entre les molécules du cristal sont fragiles. Au contraire, la protéine d'une capside est insoluble dans les conditions analogues. Les liens intercapsomériques ne sont pas facilement rompus. La capside, et, par voie de conséquence, le virion, possèdent un haut degré de stabilité.

Un virion est, nous l'avons dit, métaboliquement inerte, incapable de reproduire ses parties constitutives, incapable de croître et de se diviser. Pour que soit déclenchée la phase végétative, le matériel génétique viral emprisonné doit être libéré de sa capside. Le bactériophage a résolu le problème par la formation d'un appareil fonctionnant à la manière d'une seringue qui injecte le matériel génétique dans l'hôte bactérien. Les virions animaux et végétaux semblent pénétrer dans la cellule comme tels et la phase végétative ne peut commencer que lorsque le génome viral est libéré de la capside.

Des virions peuvent être adsorbés sur une cellule, pénétrer dans son intimité à un degré tel qu'ils deviennent insensibles à l'action neutralisante des anticorps, et cependant rester infectieux. Tel est le cas du virus de la grippe dans les éléments blancs du sang. Par conséquent, ce n'est pas n'importe quel type de milieu cellulaire qui peut induire la libération du matériel génétique du virion.

L'état de stabilité maximum d'un mélange de capsomères et d'acide nucléique implique un arrangement régulier. Dès qu'un capsomère a été fixé à un filament ou à un peloton de matériel génétique, il doit se créer une perturbation et des modifications de la distribution qui tendent à établir une symétrie. La première étape de l'organisation des virions animaux et du bactériophage est la condensation de l'acide nucléique qui est suivie ou accompagnée par la formation d'une capside. Les deux phénomènes

doivent tous deux être gouvernés par les propriétés de la cellule-hôte à une phase donnée de l'infection. Au cours du cycle viral, les liens intercapsomériques sont donc, soit rompus après l'infection, soit formés à la fin de la phase végétative.

Il semble raisonnable d'accepter l'hypothèse selon laquelle la formation de la capside aussi bien que son ouverture sont gouvernées par le « milieu cellulaire » à une phase donnée du cycle viral. La libération du matériel génétique aussi bien que son emprisonnement étant des événements nécessaires du cycle évolutif d'un virus, les capsomères doivent être construits de telle sorte qu'ils puissent être facilement unis et séparés.

CONCLUSION.

Toute définition de la nature virale doit nécessairement postuler l'existence d'un système infectieux complexe organisé spécifique reproduit à partir de son seul matériel génétique. Le système viral infectieux, le virion, peut être considéré comme un composé du type « clathrate » dans lequel la composante génétique est enfermée dans une coque, ou capside, formée de sous-unités, ou capsomères.

Il n'est point de virion sans capside, ni de capside sans capsomères. Le génome viral doit donc nécessairement contenir l'information correspondant à la structure capsomérique qui pourrait être spécifiquement virale.

SUMMARY

Any definition of the viral nature must necessarily postulate the existence of a specific complex organized infective system reproduced from its sole genetic material. The viral infective system, the *virion*, may be considered as a clathrate type of compound in which the genetic component is enclosed in a coat or *capsid* formed of subunits or *capsomeres*.

There is no virion without capsid, nor capsid without capsomeres. The viral genome must necessarily contain the information corresponding to the capsomeric structure which could well be specifically viral.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HERSHEY (A. D.) et CHASE (M.). *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.
- [2] GIERER (A.) et SCHRAMM (G.). *Nature*, 1956, **177**, 702.
- [3] FRAENKEL-CONRAT (H.). *J. am. chem. Soc.*, 1956, **78**, 882.
- [4] LWOFF (A.). *J. gen. Microb.*, 1957, **17**, 239.
- [5] LURIA (S. E.). *Symposium on immunity and virus infection*. Vanderbilt University, 1958.

- [6] JACOB (F.). *The Harvey Lectures*, Academic Press, 1958-1959, série 54 (sous presse).
 - [7] BERNAL (J. D.) et FANKUCHEN (I.). *J. gen. Physiol.*, 1941, **25**, 111.
 - [8] SCHRAMM (G.). *Z. Naturf.*, 1947, **2 B**, 249.
 - [9] HODGKIN (D. C.). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1950, **14**, 65.
 - [10] CASPAR (D. L. D.). *Nature*, 1956, **177**, 475.
 - [11] CRICK (F. H. C.) et WATSON (J. D.). *Nature*, 1956, **177**, 473.
 - [12] CRICK (F. H. C.) et WATSON (J. D.). *The nature of viruses*. Ciba Foundation Symposium, London, 1957, 5.
 - [13] POWELL (H. M.). *J. chem. Soc.*, 1948, **4**, 61.
 - [14] PIRIE (N. W.). *Adv. in Virus Res.*, 1957, **4**, 159.
 - [15] KELLENBERGER (E.). In *Symposium on virus growth and variation*. Cambridge University Press, 1959.
 - [16] JACOB (F.), FUERST (C. R.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 724.
 - [17] BEARD (J. W.). In *Symposium on Latency and masking in viral and rickettsial infections*. Burgess, Minneapolis, 1957, 201.
-

ÉTUDE DES FACTEURS INTRINSÈQUES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EXPLIQUANT L'ÉTAT DE QUIESCENCE ET LES ÉCHECS DE CULTURE SUR MILIEUX USUELS

par P. J. COLETSOS (*)

(avec la collaboration technique de M^{lles} E. ORIoT, N. DE REGEL et
M. G. MACHAVOINE).

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose [D^r J. BRETEY])

Dans notre précédent exposé nous avons étudié les facteurs extrinsèques de *M. tuberculosis* rendant aléatoire sa culture *in vitro* [1], à savoir :

- a) Rôle néfaste sur la vitalité du bacille, de toutes les opérations préliminaires à la culture (fluidification, purification, centrifugation, etc.) désignées sous le nom unique d'homogénéisation ;
- b) Rôle du véhicule (mucus, urines, caseum), de la conservation, influence de l'eau salée, dite physiologique ;
- c) Rôle néfaste des antibiotiques, spécifiques ou non, des anesthésiques volatils et des vapeurs d'alcool éthylique.

Dans le présent exposé nous abordons l'étude des facteurs intrinsèques de *M. tuberculosis* et de l'état de « quiescence » en relation avec les échecs de culture *in vitro* sur milieux standard.

A. — ÉTUDE DES FACTEURS INTRINSÈQUES DE *M. tuberculosis* NON SOUMIS A L'INFLUENCE DE LA CHIMIOTHÉRAPIE.

Ces facteurs intéressent d'une façon générale toutes les souches bacillaires sans distinction. Ils se réfèrent à la composition essentiellement hétérogène de toute population microbienne, et plus particulièrement lors de la primo-culture à partir d'organes ou de produits pathologiques.

Cette hétérogénéité est fonction :

1° De l'âge des éléments constitutants : éléments morts, sènes-

(*) Société Française de Micrologie, séance du 14 mai 1959.

cents, adultes et très jeunes, dont le taux respectif varie considérablement d'un prélèvement à l'autre ;

2° *De l'origine* : pulmonaire, rénale, ganglionnaire, cutanée, etc. ;

3° *Du type et de l'ancienneté de la lésion* ;

4° *Du mode de prélèvement du produit pathologique* : des différences appréciables existent entre la flore bacillaire prélevée artificiellement (biopsie, ponction, curetage, pièce d'exérèse chirurgicale) et la flore bacillaire récoltée après expulsion spontanée.

Le prélèvement par bronchoscopie ou par cathétérisme urétéral porte en réalité sur des bacilles en voie d'expulsion non achevée. Quant au tubage gastrique, il capte une expectoration déviée de son conduit d'expulsion naturel.

On conçoit donc aisément que dans le poumon, où des lésions d'ancienneté et de types essentiellement différents peuvent coexister, la flore bacillaire constitue une véritable mosaïque d'une diversité insoupçonnée.

Cette diversité biologique bacillaire se reflète dans la culture par la différence d'aspect, de taille et la plus ou moins grande rapidité d'apparition des colonies.

Les cultures effectuées à partir des produits pathologiques des sujets traités sont presque toujours composées de colonies très hétéromorphes.

Outre ces différences macroscopiques, d'autres particularités peuvent être mises en lumière.

En effet, certains bacilles, après avoir amorcé et réalisé deux ou plusieurs divisions, cessent de se multiplier. Ces microcolonies ou « colonies avortées » sont décelables uniquement par raclage de la surface du milieu et examen au microscope.

Enfin d'autres bacilles, après deux ou trois mois d'incubation et plus, parviennent à donner naissance à des colonies macroscopiques, à la limite de la visibilité, mais celles-ci, repiquées sur milieu neuf et surtout sur un milieu de composition différente, sont incapables de se multiplier.

Ces dernières éventualités apparaissaient jusqu'alors sans grande importance pour le bacille de la tuberculose, parce qu'exceptionnelles d'une part, et parce qu'il était rare que l'on assistât à un échec de culture total chaque fois que l'on était en droit de supposer ensementer des bacilles vivants.

B. — FACTEURS INTRINSÈQUES DU BACILLE CONDITIONNÉS PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE.

On sait que l'activité antibacillaire d'une drogue est en rapport direct avec son pouvoir de diffusion dans l'organisme, la facilité de sa pénétration intracellulaire [2] et son aptitude à se

substituer ou à s'interposer dans la chaîne métabolique et enzymatique normale du bacille [3].

Cependant, certains bacilles possèdent la capacité de dévier leurs activités métaboliques et enzymatiques du circuit habituel dans lequel l'antibiotique s'interpose et échappent ainsi à son action bactéricide.

Le fait que nous relevons systématiquement et à de rares exceptions près, un nombre plus important de colonies bacillaires sur les tubes témoins que sur les tubes contenant des taux médicamenteux supra- ou infra-bacillostatiques, en constitue la preuve.

Comment expliquer la présence insolite d'éléments sensibles au sein d'une population résistante dans son immense majorité ?

Dans l'état actuel de nos connaissances et à l'appui des observations dont nous faisons état plus loin, il apparaît nettement que le développement des mutants résistants ne constitue pas l'unique moyen assurant la survie et la pérennité de l'espèce bacillaire.

1° BACILLES EN ÉTAT DE « QUIESCENCE ». — La persistance d'éléments bacillaires sensibles au sein des lésions d'un organisme traité semble être assurée grâce :

a) A la réduction des échanges du bacille avec le milieu ambiant, ce qui lui éviterait l'utilisation de la drogue poison ;

b) A l'interruption de sa multiplication, phase au cours de laquelle l'action des antibacillaires est des plus redoutables ;

c) A l'utilisation de refuges naturels : recessus des cavités, ganglions lymphatiques, etc., difficilement accessibles aux antibacillaires.

Ainsi certains bacilles entreraient dans un état de sommeil, sorte d'hibernation ou « état de quiescence » suivant l'heureuse expression du professeur Jensen [4].

Toutefois, de même qu'au départ un nombre infime de bacilles sont aptes à se révéler résistants, de même un petit nombre de bacilles parviennent à s'adapter à ce mode de vie au ralenti. La permanence d'antibiotiques dans l'organisme constitue l'obstacle majeur à la survie de ces bacilles en plus grand nombre.

Alors que les chances d'apparition des lignées résistantes paraissent dépendre :

a) Du nombre de bacilles présents avant l'attaque par les antibacillaires ;

b) Du mode d'attaque par les antibacillaires en ordre dispersé et non de façon simultanée et coordonnée d'emblée.

Les chances des bacilles d'entrer en « état de quiescence » paraissent dépendre :

a) Du pouvoir de diffusion et de pénétration intracellulaire de

l'antibiotique utilisé qui est d'autant moins prononcé que son poids moléculaire est plus élevé ;

b) Des facultés et aptitudes *acquises* par certains bacilles à vivre et proliférer en atmosphère sous-oxygénée, donc avec un minimum d'échanges, antérieurement à l'attaque par les antibacillaires (population bacillaire active au sein d'une caverne sans communication perméable avec les bronches, ganglions, lésions osseuses, etc.) ;

c) Des facultés et aptitudes *innées* d'autres bacilles à vivre et proliférer très lentement et de préférence en atmosphère sous-oxygénée. Tel est le cas du bacille bovin qui, outre sa multiplication très lente, a une prédilection marquée pour les localisations extrapulmonaires.

Nous avons fait mention plus haut de la traduction de ces aptitudes du bacille sur le plan cultural : colonies différées, d'aspect et de caractère dysgonique dans le sens étymologique du mot.

A cet égard, il est intéressant de signaler qu'au Service de la Tuberculose à l'Institut Pasteur, les demandes d'identification des souches humaines et bovines ont décuplé depuis l'utilisation des antibiotiques, alors que le pourcentage des souches bovines reste sensiblement le même.

In vivo, ces aptitudes particulières du bacille se traduisent par la tuberculisation excessivement lente du cobaye, six à douze mois et plus, délais que seule la voie intramédiastinale que nous préconisons [5, 6] arrive à écourter pour des raisons que nous cherchons à élucider.

Aussi pensons-nous que l'entrée des bacilles en « état de quiescence » n'est pas le résultat d'un effet du hasard, mais soit le résultat d'une réaction de défense du bacille face à l'agression et à la présence d'antibiotiques, soit l'aboutissement d'une préparation pour résister aux réactions normales de l'organisme, qui, on le sait, à défaut de pouvoir expulser ses hôtes indésirables, s'efforce de les enkyster, de les priver totalement d'oxygène, de les désintégrer et de provoquer leur mort *in situ*.

On conçoit donc que les aptitudes à la « quiescence » puissent varier selon la nature des bacilles, l'ancienneté et la structure anatomique du foyer bacillaire.

Faut-il rappeler que les formes chroniques même paucibacillaires sont plus rebelles à l'antibiothérapie et plus sujettes à des rechutes que les formes récentes même très richement bacillifères ?

En conséquence, les chances de faire revivre hors de l'organisme les bacilles « quiescents » ne sauraient être les mêmes pour tous les prélèvements.

Quant aux bacilles contenus dans des foyers à caséum solide et *a fortiori* en voie de calcification, bacilles dont l'aspect microscopique est très rarement caractéristique et qui sont presque

toujours en voie de désintégration, on ne saurait les assimiler à des bacilles « quiescents ». D'ailleurs, tous les auteurs étaient d'accord pour les considérer comme morts avant l'avènement des antibacillaires [7].

2° BACILLES « PERSISTANTS SENSIBLES », BACILLES « QUIESCENTS » ET CONTEXTE THÉRAPEUTIQUE. — Deux phases du traitement correspondent le plus fréquemment aux caractères culturels très particuliers des bacilles à métabolisme perturbé, ce sont :

a) La période d'attaque par la chimiothérapie ou l'intervention d'un nouvel antibiotique dans la thérapeutique des sujets déjà traités.

Les premières semaines après le début de la période d'attaque par les antibiotiques, les cultures offrent un aspect bigarré : elles se composent de colonies très hétéromorphes, de taille, de vitalité et de viabilité très inégales. En outre, leur apparition est très échelonnée dans le temps. Le nombre de colonies différées sur les tubes témoins, issues des bacilles « persistants sensibles », est à cette phase très important.

b) La phase de saturation de l'organisme par les antibiotiques chez les bacillaires chroniques.

Après trois à six mois de traitement et à condition que depuis peu aucun nouvel antibiotique ne soit intervenu dans la thérapeutique, l'aspect et la forme des colonies sont moins perturbés, qu'il y ait eu ou non développement de lignées résistantes, mais il est exceptionnel de ne constater qu'une seule sorte de colonies.

Pour les bacilles qui ne cultivent pas facilement, si l'on conserve les tubes à l'étuve à 37°, deux, trois mois et plus, on voit dans maints cas apparaître de rares colonies bien individualisées. Elles parviennent exceptionnellement à la taille adulte et elles se révèlent très difficilement repiquables, donc de viabilité aléatoire.

Ce sont des colonies issues de bacilles « quiescents » et qui ne peuvent arriver à l'état de maturation qu'à la faveur de circonstances exceptionnelles et fortuites, telles le développement de moisissures sur le bouchon de coton ou la contamination venant de la profondeur du milieu par un germe, sporulé ou non.

S'agit-il d'un apport de facteurs de croissance avec neutralisation concomitante des effets toxiques de la drogue sur le bacille ?

C'est fort probable, mais un autre facteur semble intervenir pour favoriser le développement de ces colonies.

En effet, dans nombre des cas de ce genre, avec ou sans contamination secondaire, l'introduction à travers le capuchon en caoutchouc d'une aiguille reliée à un manomètre nous a révélé l'existence d'une dépression de 10, 15 et 30 cm d'eau, ce qui ne laisse aucun doute sur l'interdépendance de ces faits avec la respiration, question importante sur laquelle nous reviendrons.

Par contre, chaque fois que l'on a affaire à des bacilles strictement aérophiles, la culture est luxuriante sur les tubes bien aérés et très dysgonique ou nulle sur les tubes hypoventilés.

De ces constatations nous avons tiré les conclusions suivantes :

a) Les bacilles « quiescents » sont beaucoup plus exigeants sur le plan nutritionnel que les bacilles résistants ;

b) La « modulation » de la respiration joue un rôle particulièrement important dans le démarrage des colonies à bacilles « quiescents », l'atmosphère sous-oxygénée étant plus favorable à leur développement initial.

Ces deux principes nous ont servi de guide dans la réalisation des milieux appropriés à la culture de bacilles de vitalité et de viabilité réduites en général et des bacilles « quiescents » en particulier.

3° QUELS SONT LES BACILLES SUSCEPTIBLES D'ENTRER EN « ÉTAT DE QUIESCENCE » ? — Jusqu'à présent, du fait des difficultés ou de l'impossibilité de cultiver ces bacilles *in vitro* et de tuberculiser le cobaye par inoculation de produits pathologiques contenant des bacilles non cultivables, cette question n'a pas trouvé sa réponse.

A défaut de preuves objectives et devant le fait que de nombreux malades continuaient à émettre des bacilles et parfois en nombre considérable on se bornait à formuler l'hypothèse que les bacilles non cultivables n'étaient probablement pas tous morts et qu'ils trouvaient dans l'organisme humain des conditions que nos milieux de culture étaient incapables de leur assurer.

En était-il de même pour le cobaye ?

Force nous était de l'admettre sans en connaître exactement la raison, d'autant plus que la grande sensibilité du cobaye à l'égard du *M. tuberculosis* n'avait jamais été mise sérieusement en doute, avant la découverte de la perte de virulence des bacilles INH-résistants.

Quant à la nature des bacilles susceptibles d'entrer en « état de quiescence », rien ne pouvait être avancé avec certitude.

A la lumière de nos expériences et grâce aux milieux spéciaux adaptés par nous à la culture des bacilles de vitalité et de viabilité réduites, nous pouvons affirmer aujourd'hui :

a) Que tous les bacilles, aussi bien sensibles que résistants aux antibiotiques, sont susceptibles d'entrer en état de « quiescence » ;

b) Que dans la majorité des cas il s'agit d'un mélange de bacilles sensibles et de bacilles mono- ou pluri-résistants ;

c) Que les antibiotiques suscitent l'entrée des bacilles en « état de quiescence », mais qu'en dehors d'eux le phénomène est également possible et même habituel chez les tuberculeux chroniques.

Quant au mécanisme qui conduit les bacilles résistants à la « quiescence », nous le concevons comme suit :

Certains bacilles devenus résistants à la streptomycine (antibiotique administré le premier au malade en association avec le PAS et *a fortiori* seul) cessent leur multiplication active et entrent en état de quiescence, échappant ainsi à l'action bactéricide de l'INH administré à distance de la streptomycine.

Ces bacilles, par la suite, se révèlent inaptes à se multiplier sur milieux habituels et ne donnent une culture positive que sur milieux spéciaux. Comme il n'y a pas de raison que la perte de vitalité de ces bacilles ait pour corollaire la perte de leur résistance à la streptomycine, ce sont des bacilles résistants à cet antibiotique et sensibles à l'INH que nous voyons revivre ou *vice versa*.

Pour les bacilles résistants aux trois antibiotiques majeurs, et devenus « quiescents », l'explication est plus difficile.

Est-ce à cause d'un renforcement des doses et d'une association mieux équilibrée ?

Tout en n'excluant pas cette hypothèse, nous devons mentionner que dans deux cas de ce genre, la cyclosérine était depuis quelque temps déjà entrée en action chez ces malades.

Il semble même que depuis l'avènement de la cyclosérine, le nombre des malades qui éliminent des bacilles peu ou pas cultivables soit en nette progression.

4° LA REPRODUCTION *in vitro* DU PHÉNOMÈNE DE LA QUIESCENCE EST-ELLE POSSIBLE ? — *A priori* cela apparaît impossible pour les raisons suivantes :

a) Les conditions de développement et de multiplication des bacilles sur un milieu de culture sont loin d'être comparables à celles offertes dans l'organisme.

b) *In vitro* les antibiotiques restent à un taux relativement stable, seul le séjour prolongé à l'étuve entraîne une diminution de leur activité. Mais entre temps le milieu devient impropre à la culture, ce qui rend difficile le « démarrage » tardif des colonies à bacilles « quiescents ».

Par contre, chez l'homme, la présence d'antibiotiques est soumise à des fluctuations permanentes : oscillation des taux de concentration et d'élimination, inactivation de la fraction active de la drogue sur le bacille par acétylation par exemple ; enfin et surtout, les conditions d'ordre nutritionnel sont illimitées et constamment renouvelées chez l'homme, alors qu'*in vitro* elles s'ameublissent par le vieillissement du milieu.

c) La soustraction d'antibiotique du milieu de culture sans perturber l'équilibre de celui-ci est irréalisable *in vitro*, alors que chez l'homme il suffit d'interrompre le traitement pour l'obtenir.

A défaut de toutes ces possibilités il ne nous reste, pour tenter de reproduire le phénomène de la « quiescence » *in vitro* qu'une éventualité : celle qui consiste à neutraliser l'antibiotique par l'addition au milieu d'un antidote.

Compte tenu de toutes ces réserves et de nos possibilités très restreintes, seuls le PAS et son antagoniste le PAB autorisent actuellement un tel essai *in vitro* et à la condition d'utiliser des populations bacillaires provenant directement de l'homme.

Il s'agira donc d'une mise en évidence *in vitro* de bacilles « persistants » et « quiescents » d'origine organique, plutôt que d'une sélection de tels bacilles par des artifices de laboratoire.

C'est dans ce but que nous avons tenté les deux expériences ci-après.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Plusieurs séries de tubes de Legroux contenant du milieu de Jensen imprégné de taux croissants de PAS (0,1, 0,5, 1, 2, 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}_2$ [8]) sont ensemencées avec des expectorations de malades jamais traités par les antibiotiques ; d'autres séries, avec des expectorations de malades traités par les antibiotiques, y compris le PAS et ayant conservé une sensibilité rigoureusement normale à ce dernier.

Toutes les séries comportent trois tubes témoins (PAS 0) et certaines, des tubes supplémentaires avec des taux infra-bacillostatiques 0,01 et 0,05 μg de PAS.

Une première série complète, série témoin qui servira de guide et de comparateur, après ensemencement est mise à l'étuve à 37° et le nombre des colonies est noté tous les quinze jours et pendant une durée de trois mois.

Une deuxième série identique à la série témoin reçoit, quarante-huit heures après, des taux convenables de PAB en poids équimoléculaire au PAS.

Même façon de procéder pour d'autres séries : quatre, huit, quinze, vingt et un et trente jours après la date de l'ensemencement de bacilles en présence de PAS.

RÉSULTATS.

1° *Sur la série témoin* (A tabl. I) qui ne reçoit pas de PAB, seuls le tube témoin (PAS 0) et les tubes contenant des taux infra-bacillostatiques de PAS (0,01 et 0,05 μg) donnent des colonies.

En effet, l'ensemencement étant peu riche en bacilles (moins de 200 colonies sur le tube témoin) l'apparition des mutants résistants est pratiquement exclue.

2° Sur les deuxième et troisième séries (B tabl. I) : PAS + PAB deux jours et quatre jours après, tous les tubes donnent des colonies en nombre égal et dans certaines concentrations, supérieur à celui relevé sur les tubes témoin (PAS O).

A quoi cela peut-il être attribué ?

Depuis les travaux de Bernheim [9] nous savons que l'acide salicylique et l'acide benzoïque stimulent la respiration bacillaire. Ce phénomène est connu sous le nom d'« effet salicylique ».

Le PAS, découvert par Lehmann [10], n'inhibe pas les échanges respiratoires du bacille comme l'avait pensé initialement son inventeur. Le PAS lui aussi, à de très faibles concentrations, semble exercer sur le bacille, et de façon très éphémère, un « effet salicylique ».

En outre, les travaux de Lehmann ont confirmé pour le PAS ce qui avait déjà été démontré auparavant par J. Tréfouël et d'autres auteurs [11 à 14] à propos des sulfamides et par N. Rist à propos des sulfones [15], à savoir : l'action bactériostatique différée de certains antibiotiques qui n'agissent qu'après la réalisation de trois ou plusieurs divisions microbiennes.

Ce n'est donc que secondairement et après plusieurs divisions cellulaires que le PAS exerce son action antibacillaire spécifique.

Or ici le PAB (antagoniste du PAS) est intervenu juste avant que le PAS ait pu exercer son action bacillostatique.

De ce fait, les bacilles conservent le bénéfice initial dû à « l'effet salicylique » passager du PAS, d'où il résulte un plus grand nombre de colonies sur les tubes contenant du PAS + PAB que sur les tubes témoins.

De cette constatation il se dégage une notion particulièrement intéressante, à savoir :

a) Que certaines souches d'origine organique contiennent un nombre assez variable de bacilles qui, sous une influence extérieure, en l'occurrence la stimulation éphémère des échanges respiratoires, peuvent se développer *in vitro* alors que sans cela ils ne se seraient jamais révélés par l'apparition de colonies macroscopiques ;

b) Qu'à l'opposé et comme nous les verrons par la suite, les bacilles « quiescents » parviennent au même résultat par un processus inverse à condition de les protéger de l'air atmosphérique durant la phase initiale de l'incubation.

S'agit-il d'une stimulation d'ordre métabolique, d'ordre respiratoire, ou des deux ?

Il nous paraît difficile d'admettre l'un sans l'autre. Car le même phénomène peut être observé par addition soit de très faibles taux de PAS et de PAB, soit d'un taux convenable d'acides pyruvique, glutamique ou pantothénique.






























Il est assez malaisé d'ailleurs de préciser exactement le rôle de

chacun de ces facteurs de croissance utilisés séparément, et *a fortiori* en association.

A cet égard le PAB ne doit pas être considéré uniquement et exclusivement du point de vue de son action antagoniste sur le PAS, mais également quant à son rôle enzymatique stimulant la croissance bacillaire [13].

Quoi qu'il en soit, il apparaît maintenant que dans les conditions de culture habituelles, nombre de bacilles restent « figés »

TABLEAU I.

	Séries		Y/cm^2								
			T	0,01 Y	0,05 Y	0,1 Y	0,5 Y	1 Y	2 Y	5 Y	10 Y
1 ^{re} EXPÉRIENCE	A	P.A.S. seul				(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	B	P.A.S. + (P.A. B. 2 et 4 jours après)									
	C	P.A.S. + (P.A.B. 8 et 15 jours après)								(-)	(-)
	D	P.A.S. + (P.A.B. 21 jours après)							(-)	(-)	(-)
	E	P.A.S. + (P.A.B. 30 jours après)					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2 ^e EXPÉR.	D ^{bis}	P.A.S. + (P.A.B. + <u>foie de singe</u> 21 jours après)									(-)
	E ^{bis}	P.A.S. + (P.A.B. + <u>foie de singe</u> 30 jours après)								(-)	(-)

 = 100 colonies  = 25 colonies  = ≤ 10 colonies (-) = culture négative

et ne se multiplient pas : soit parce que trop jeunes et incomplètement évolués (cas sur lequel ont insisté Nègre et Bretey [16]), soit parce qu'impressionnés par les antibiotiques exigent des substances que nos milieux de culture sont incapables de leur fournir, soit parce qu'insuffisamment protégés de l'O₂ de l'air atmosphérique : bacilles « persistants sensibles » et « quiescents ».

La conclusion pratique qui se dégage est que, dès la phase initiale, c'est-à-dire, dès l'ensemencement il faut offrir aux bacilles des milieux et des conditions de culture variés, sinon un nombre variable de bacilles risque de ne jamais se révéler par l'apparition de colonies macroscopiques.

3° Sur les séries qui reçoivent le PAB les huitième et quinzième jours (C tabl. I) après l'ensemencement en présence de PAS, les

colonies vont *decrescendo* pour n'être que très rares aux concentrations de PAS-PAB égales à 2 μg .

4° *Sur les séries qui reçoivent le PAB le vingt et unième jour* (D tabl. I) quelques très rares colonies apparaissent sur le tube à 1 μg de PAS-PAB et aucune colonie à 2 μg et plus.

Quelques dizaines de ces colonies prélevées une à une et testées au PAS se révélèrent normalement sensibles (inhibition totale par 0,1 μg de PAS).

Elles sont donc incontestablement issues de bacilles « persistants sensibles » bactériostasiés.

5° *Sur les séries qui ont reçu le PAB le trentième jour qui a suivi l'ensemencement en présence de PAS* (E tabl. I), seul le tube qui contenait initialement 0,1 μg de PAS a donné naissance à quelques colonies. Sur les autres tubes, pas une seule colonie n'a été révélée.

Le fait que quelques colonies soient apparues dans le tube à 0,1 μg de PAS + 0,1 μg de PAB montre que le milieu avait conservé ses aptitudes culturales. Le fait aussi que pas une seule colonie ne soit apparue dans les tubes contenant 0,5 μg de PAS + 0,5 μg de PAB et davantage semble démontrer que les bacilles restés en contact continu avec des taux supra-bacillostatiques de PAS pendant trente jours étaient définitivement tués.

Cette expérience nous a appris :

a) Qu'un court contact (quarante-huit à quatre-vingt-seize heures) des bacilles avec des taux relativement faibles de PAS et à condition que celui-ci soit neutralisé par des taux convenables de PAB, permet de dénombrer 50 p. 100 de colonies supplémentaires à 5 et 10 μg de PAS-PAB et 100 p. 100 à 0,1, 0,5 et 1 μg de PAS-PAB.

Donc « l'effet salicylique » de la combinaison PAS-PAB contribue à la révélation de colonies supplémentaires en nombre parfois considérable.

b) Que l'addition de PAB après vingt et un jours de contact des bacilles avec le PAS permet encore la reviviscence de quelques colonies jusqu'à 1 μg de PAS-PAB, mais d'aucune colonie aux concentrations plus élevées.

c) Que le contact continu des bacilles pendant trente jours avec des taux de PAS égaux ou supérieurs à 0,5 μg entraîne une bactériostase totale et définitive et que, de ce fait, l'intervention du PAB à cette date se révèle incapable de faire revivre le moindre bacille.

Donc l'effet de bactériostase du PAS est très prononcé et très partiellement réversible par l'intervention du PAB au vingt et unième jour.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Nous avons cherché à savoir si les bacilles « réanimés » par l'intervention tardive (vingt et unième et trentième jours) du PAB représentaient la totalité des éléments bacillaires viables et si nous n'arriverions pas à obtenir des colonies supplémentaires. Dans ce but et dans des séries rigoureusement parallèles aux précédentes, nous avons ajouté au vingt et unième et au trentième jour de contact continu des bacilles avec le PAS, des taux équimoléculaires de PAB et en plus 0,5 cm³ par tube de pulpe de foie de singe, soit simple, soit dans un excipient de gélatine.

La gélatine à un taux et un pH convenables, ajoutée à la surface du milieu déjà ensemencé, joue le rôle d'un écran protecteur à l'égard des bacilles « quiescents », dont l'amorce des premières divisions est plus facilement réalisable à l'abri de l'O₂ de l'air atmosphérique.

Des expériences antérieures nous ont appris que cette façon de protéger les bacilles de l'O₂ de l'air atmosphérique assurait une meilleure « modulation » de leurs besoins respiratoires que la réalisation d'une atmosphère sous-oxygénée par insufflation à l'intérieur des tubes, d'air enrichi en CO₂ [17].

En effet, la protection des bacilles de vitalité réduite n'est utile que pendant la phase initiale de la culture, car aussitôt que la constitution des microcolonies paraît assurée, les besoins en O₂ des bacilles augmentent et leur épanouissement en colonies macroscopiques eugoniques est favorisé par une atmosphère normalement oxygénée.

D'autre part, le temps nécessaire à la constitution des microcolonies étant imprévisible et essentiellement variable d'une population bacillaire à une autre et même d'une colonie à l'autre, l'introduction d'air enrichi en CO₂ à l'intérieur des tubes réalise des conditions uniformes et arbitraires sur le plan respiratoire, ce qui fait que les résultats des cultures sont des plus aléatoires.

RÉSULTATS.

Pour les bacilles restés en contact pendant vingt et un jours avec des taux croissants de PAS nous avons relevé :

1° Un nombre de colonies deux fois plus important sur les tubes qui contenaient jusqu'à 1 µg de PAS-PAB plus de la pulpe de foie de singe, que sur les tubes correspondants qui contenaient uniquement du PAS-PAB ;

2° De rares colonies isolées viables, repiquables et normalement sensibles au PAS en présence de 2 et 5 µg de PAS-PAB plus foie

de singe, contre zéro colonie sur les tubes à 2 et 5 μg de PAS-PAB sans foie de singe (*Cf.* séries D et D *bis*, tabl. I).

Pour les bacilles restés en contact pendant trente jours avec des taux croissants de PAS nous avons noté :

1° Que l'addition de PAB seul est incapable de faire revivre des bacilles et de permettre l'apparition de colonies à plus de 0,1 μg de PAS-PAB ;

2° Que l'addition de PAB plus foie de singe permet le développement de rares colonies macroscopiques à des concentrations cinq, dix et vingt fois plus élevées (*Cf.* séries E et E *bis*, tabl. I).

Cette expérience démontre :

a) Que la culture de certains bacilles nécessite l'addition extemporanée au milieu d'extraits organiques, et plus particulièrement de pulpe de foie de singe ;

b) Que les bacilles en « état de quiescence » se développent plus aisément sous une mince pellicule de gélatine qui les protège de l'O₂ de l'air atmosphérique à la phase initiale de la culture ;

c) Qu'un parallélisme complet est relevé entre les conditions d'ordre nutritionnel et respiratoire que l'on doit assurer à ces bacilles pour obtenir leur développement et leur multiplication *in vitro* et les conditions qui existent chez l'homme.

DISCUSSION.

Les essais expérimentaux poursuivis pendant ces dernières années dans notre laboratoire, dans le but d'éclaircir le problème des bacilles visibles et apparemment non viables, nous conduisirent à adopter et à suggérer l'observation de certaines règles d'ordre pratique résumées ci-après.

D'une façon générale et faisant abstraction des cas particuliers, le milieu à l'œuf du type Löwenstein-Jensen enrichi suffit pour assurer le développement de la majorité des bacilles, même de vitalité réduite.

Cet enrichissement consiste en l'incorporation au milieu avant coagulation : 1° D'oligo-éléments dont le rôle comme biocatalyseurs a été préconisé et précisé sur le plan biologique général par Gabriel Bertrand [18] dès 1903 et dont l'influence sur le développement du bacille de Koch a été établie en particulier par Berthelot [19] ;

2° De certains amino-acides et plus spécialement des acides pyruvique et glutamique. Rappelons que le rôle stimulant du pyruvate sur les bacilles dysgoniques du type bovin a été préconisé en 1934 par Berthelot et van Deinse [20].

D'autres amino-acides et d'autres substances, telles que les phyto-hormones, biotine et gibberelline, l'extrait de champignons, certaines vitamines, l'extrait de fléole, les corps de bacilles morts, etc., ajoutés extemporanément en surface peuvent améliorer

la sensibilité du milieu de Löwenstein-Jensen sur un des trois points suivants : plus grand nombre de colonies à ensemencement égal, apparition plus précoce des colonies, colonies eugoniques plus volumineuses.

Lorsque ces trois conditions se trouvent réunies, elles attestent la valeur et la supériorité d'un milieu expérimental sur les milieux jusqu'alors en usage (1).

Malheureusement il en est rarement ainsi, c'est pourquoi l'addition supplémentaire de ces dernières substances reste limitée à des cas très particuliers.

Cependant, pour certains bacilles, le milieu à l'œuf enrichi d'oligo-éléments de pyruvate et d'acides aminés que nous utilisons comme milieu de base, se révèle insuffisant, et l'addition extemporanée à l'ensemencement d'extraits organiques devient indispensable.

Il apparaît donc que seuls les extraits organiques réunissent sans dommage pour les bacilles normaux les trois conditions qui précèdent.

En outre, et comme nous le signalons plus haut, les besoins d'ordre nutritionnel et respiratoire des bacilles « persistants sensibles » et des « quiescents » diffèrent essentiellement de ceux des bacilles normaux.

Cela nous amena à réaliser de façon très simple la « culture en double couche » et la « culture sous cape », par l'addition à la surface du milieu de substances stimulantes sous une mince pellicule de gélatine.

D'autre part, une étude comparative nous permet d'apprécier les différences qui existent dans la stimulation de ces bacilles suivant la nature, l'origine et le mode de préparation des extraits organiques.

Par ordre d'intérêt croissant, ces extraits peuvent être classés comme suit :

a) Albumine (fraction V), extrait globulaire, sérum, liquide d'ascite, cellules de culture de tissus ;

b) Extraits d'organes existant en spécialités ;

c) Extraits d'organes frais (foie, cerveau, thymus) de veau ou de cobaye sain (foie, rein, poumon) ; enfin et surtout :

d) Extraits d'organes de singe : pulpe rénale ou de foie de jeune singe indemne de toute affection intercurrente ou parasitaire.

(1) Les souches de collection constituent un matériel peu intéressant pour la mise au point des nouveaux milieux destinés à l'isolement des bacilles de vitalité et de viabilité réduites. Seuls les produits pathologiques bacillifères ou supposés tels, constituent un matériel de choix, ce qui a pour conséquence de prolonger les recherches pendant des mois, voire des années, avant de pouvoir tirer des conclusions valables et solidement étayées.

Ce sont ces derniers et *tout spécialement la pulpe de foie de jeune singe*, préparée dans notre laboratoire, qui nous ont donné les meilleurs résultats pour la culture *in vitro* des bacilles de vitalité et de viabilité très réduite, qui jusqu'alors étaient considérés comme non viables.

REMARQUES.

a) Les colonies bacillaires isolées en présence d'extraits organiques sur milieu à l'œuf enrichi présentent tous les caractères des bacilles typiques.

Si leur vitalité, leur virulence et leur pouvoir catalasique sont très variables, ils n'ont rien de commun avec les bacilles atypiques.

Ils ne sont ni scoto-, ni photo-chromogènes, et leurs exigences culturales ne sont en rien comparables à celles des bacilles atypiques.

b) Les souches isolées sur milieux spéciaux recouvrent leur vitalité et deviennent aptes aux repiquages sur milieux homologues ou de composition différente : Dubos, Youmans, etc.

c) En outre, elles se révèlent toujours pathogènes pour le cobaye et souvent très virulentes pour cet animal.

A noter que dans maints cas l'inoculation directe du produit pathologique richement bacillifère (expectoration ou urines) ne provoque chez le cobaye aucune lésion, tout au plus un simple virage des tests tuberculiniques, alors que l'inoculation de la souche, issue par la culture de ces mêmes bacilles en présence d'extraits organiques provenant du singe, détermine une tuberculose expérimentale typique, surtout lorsque l'inoculation est effectuée par voie intramédiastinale.

CONCLUSIONS.

De l'ensemble de ces recherches et investigations à propos des bacilles de vitalité et de viabilité réduites, certains points semblent être mis en lumière et quelques notions nouvelles nous paraissent devoir être prises en considération.

I. Il ne paraît plus douteux, qu'en dehors du développement des lignées résistantes, la survie et la pérennité du bacille de la tuberculose, sérieusement compromises par les antibiotiques, semblent également être assurées :

a) Par le maintien plus ou moins prolongé au sein de l'organisme malade d'éléments « persistants sensibles » ;

b) Par l'entrée d'autres éléments en état de sommeil ou « état de quiescence ».

II. Les bacilles « persistants-sensibles » et *a fortiori* les bacilles « quiescents » ne se révèlent *in vitro* qu'en présence de substances stimulantes d'origine organique, très comparables à celles qui existent dans l'organisme humain.

III. L'action presque spécifique des substances organiques provenant du singe, expliquerait les possibilités de rechute et le maintien de lésions actives chez les tuberculeux qui hébergent et éliminent des bacilles apparemment non viables, et confirmerait l'hypothèse jusqu'alors en suspens d'après laquelle certains bacilles incontestablement pathogènes trouveraient dans l'organisme humain des conditions indispensables à leur développement que nos milieux de culture usuels, voire même le cobaye, sont incapables de leur assurer.

Aussi sommes-nous amené à nous demander si sur le plan épidémiologique il n'y aurait pas lieu d'établir une relation entre les faits expérimentaux que nous rapportons et l'éventuelle facilité de propagation d'homme à homme de ces bacilles biologiquement si exigeants.

S'il en était ainsi, on pourrait supposer que le bacille de Koch, du fait des antibacillaires, subit une involution qui tend à le rapprocher du bacille de Hansen.

SUMMARY

STUDY OF INTRINSIC FACTORS OF *Mycobacterium tuberculosis* IMPLIED IN THE QUIESCENT STATE AND CULTIVATION FAILURES ON ROUTINE MEDIA.

I. The survival and perennity of t. b., although compromised by the antibiotherapy, are maintained not only by the appearance of resistant strains, but also by :

a) The presence within the tuberculous organism of « sensitive persistent » elements ;

b) The passage of certain other elements into a « quiescent » state.

II. « Sensitive persisting » elements and *a fortiori* « quiescent bacilli » can be demonstrated *in vitro* only in presence of organic stimulating substances, very similar to those present in the human body.

III. Substances extracted from monkey organs possess an almost specific stimulating activity on the growth of such bacilli *in vitro*. This fact might account for relapses and persistence of active lesions in tuberculous patients who excrete apparently non viable bacilli, and would confirm the hypothesis following which certain pathogenic bacilli might find in the human body such

conditions as are absolutely necessary for their development and which they do not find in routine culture media, or even in guinea-pigs.

A relationship might then exist between the experimental data described and the easy propagation from man to man of these bacilli endowed with such exceptional biological requirements.

If this were so, it would suggest that t. b., owing to the use of antibacillary drugs, undergo an involution drawing them closer to Hansen bacillus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COLETSOS (P. J.), ORIOU (E.), REGEL (N. DE) et MACHAVOINE (M. G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 135.
- [2] MACKANESS (G. B.). *J. Path. Bact.*, 1952, **64**, 429 ; *Am. Rev. Tub.*, 1952, **66**, 125.
- [3] TRÉFOUËL (J.). *Actualités Pharmacologiques*, 4^e série, 1951, 171.
- [4] JENSEN (K. A.). *Bull. Union int. Tub.*, 1952, **22**, 16.
- [5] COLETSOS (P. J.), ORIOU (E.), DE REGEL (N.). *Rev. Tub.*, 1957, **24**, 952.
- [6] LEVADITI (J. C.) et COLETSOS (P. J.). *Rev. Tub.*, 1957, **24**, 997.
- [7] CANETTI (G.). *Le bacille de Koch dans la lésion tuberculeuse du poulmon*. Collection Inst. Pasteur, Flammarion, édit.
- [8] COLETSOS (P. J.), BOISVERT (H.) et ORIOU (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 288.
- [9] BERNHEIM (F.). *Science*, 1940, **92**, 204 ; *J. Bact.*, 1941, **44**, 387 ; *J. biol. Chem.*, 1942, **143**, 383.
- [10] LEHMANN (J.). *Svenska Lakartidningen*, 1946, **43**, 2029 ; *Lancet*, 1946, **1**, 15 ; *Rev. gen. Sci.*, 1947, **54**, nos 9-10.
- [11] TRÉFOUËL (J.), TRÉFOUËL (M^{me}), NITTI (F.) et BOVET (D.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 755.
- [12] FOURNEAU (E.), TRÉFOUËL (J.), TRÉFOUËL (M^{me}), NITTI (F.) et BOVET (D.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 258 et 652.
- [13] LWOFF (A.), NITTI (F.), TRÉFOUËL (M^{me}) et HAMON (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 9.
- [14] WOLFF (L. K.). *Bruxelles méd.*, 1938, **48**, 1506 ; WOLFF et JULIUS. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 616.
- [15] RIST (N.), BLOCH (F.) et HAMON (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64**, 203.
- [16] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 132 : *Les bacilles de Koch incomplètement évolués dans l'infection tuberculeuse*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1955.
- [17] MIDDLEBROOK (G.) et COHN (M. L.). *Am. J. publ. Hlth*, 1958, **48**, 844.
- [18] BERTRAND (G.). *Chem. Z.*, 1903, **27**, 613. VIII^e Congrès int. Chim. app., New-York, 1912, **28**, 30 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 216.
- [19] BERTHELOT (A.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **46**, 1553.
- [20] BERTHELOT (A.), VAN DEINSE (F.) et AMOUREUX (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **46**, 1571.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE PÉRIPHÉRIQUE DES MYCOBACTÉRIES

par Jean DESBORDES, Etienne FOURNIER, Fernand FOURNIER
et Eddy ROSENBERG (*).

*[Ecole Pratique des Hautes Etudes,
Laboratoire de Chimie Neurologique,
Section de Chimie Microbienne (Paris) ;
Laboratoire du C. N. R. S., Verville (S.-et-O.)
et Centre Hospitalier Emile-Roux
(Service du D^r JEAN PARAF)]* (**) (***)

Les travaux modernes révèlent de plus en plus l'existence d'un rapport entre la constitution physico-chimique des Mycobactéries et leur pouvoir pathogène pour la cellule de l'hôte réceptif.

A nos yeux le phénomène expérimental le plus frappant est peut-être celui connu depuis Robert Koch (1897) [14] : le bacille tuberculeux mort conserve un grand nombre des propriétés spécifiques primordiales du bacille vivant, en particulier celle de causer des désordres cytologiques chez le receveur. Par ailleurs, chez les Mycobactéries, malgré un aspect morphologique tinctorial et culturel grossièrement identique, on trouve côte à côte des germes se montrant, les uns hautement agressifs, les autres apathogènes, alors qu'à première vue, rien ne permet de les distinguer.

Depuis longtemps, on a tenté d'extérioriser les variations pouvant exister entre les germes doués d'actions physiologiques si différentes. Maintes fois ont été décrites les modifications de composition chimique ou d'aspects cytologiques ou de propriétés diverses, susceptibles d'être utilisés dans ce but. Il n'est pas de

(*) Jean Desbordes, directeur-adjoint à l'Ecole des Hautes-Etudes, et chef de Laboratoire à l'hôpital Broussais, Paris. Etienne Fournier, professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris. Fernand Fournier, maître de recherches au C.N.R.S., Laboratoire de Verville par Nesles-la-Vallée (S.-et-O.). Eddy Rosenberg, assistant au Laboratoire du Service du D^r Jean Paraf au Centre Emile-Roux (Brévannes).

(**) Travail effectué grâce aux subventions de l'Institut National d'Hygiène (Prof. Bugnard).

(***) Société Française de Microbiologie, séance du 17 avril 1959.

notre propos de les rappeler ici. Retenons cependant quelques faits essentiels.

1° Les germes pathogènes offrent souvent une formation caractéristique de cordages, moustaches.

2° Les germes pathogènes sont plus riches en constituants lipidiques que les autres. En particulier, en certaines cires dont la composition et la structure chimique ont été élucidées ces dernières années ; grosse molécule polypeptido-polysaccharido-polyacido-mycolique (Lederer [45, 46]).

3° Les germes pathogènes présentent des différences enzymatiques avec les germes apathogènes [activité déshydrogénasique, catalasique, uréasique, réductrice, etc.] (Middlebrook, Dubos [41, 48, 49, 20]).

4° Les germes pathogènes fixent énergiquement et transforment certaines molécules colorantes, alors que spécifiquement les germes apathogènes ne le font pas (travaux personnels [3, 4, 6, 8]).

5° Les germes pathogènes présentent une structure physique différente de celle des germes apathogènes, vérifiée en particulier par la diffraction des rayons X (travaux personnels [9, 12]).

Cependant, certaines de ces constatations doivent être acceptées avec prudence et les résultats obtenus doivent être finement interprétés.

Par exemple, si des variations ont été observées du point de vue de la teneur en lipides, il s'agit jusqu'ici de différences quantitatives et non pas qualitatives. On n'a pas isolé « un » lipide, dont la présence serait la signature spécifique du caractère pathogène. Cependant, en ce qui concerne la cire « D » d'Asselineau et Lederer [2], celle-ci existe à une teneur de près de 8 p. 100 du poids du bacille « virulent », alors qu'on n'en trouve que 0,50 à 2 p. 100 chez les « avirulents ». Autre exemple : si dans chaque cas où la formation de cordage est notée dans des conditions de culture bien définies, et seulement dans ce cas, on peut être certain qu'il s'agit de germes pathogènes, on peut trouver des bacilles incontestablement « virulents » qui ne présentent pas au premier abord cette particularité, parce que, au moment de l'examen, ils se sont trouvés dans des conditions physiologiques particulièrement défavorables à l'insu de l'expérimentateur. De plus, si chaque fois qu'un germe donnant une réaction cytologique positive pour une réaction nettement codifiée peut être considéré à coup sûr comme bacille virulent, on peut en trouver qui peuvent tuer le cobaye, tout en donnant une réaction négative, parce que certaines conditions sont venues, soit perturber celle-ci, soit modifier *transitoirement* la physiologie du germe *au moment de l'épreuve*. Enfin, bien que des différences existent au point de vue enzymatique, on sait que les germes virulents captent moins d'oxygène, présentant une activité déshydrogénasique plus faible.

une activité uréasique et catalasique plus forte que les avirulents. Ces activités n'interviennent pas directement dans le pouvoir pathogène puisque, après destruction, comme dans le cas de bacilles tués par la chaleur, le caractère cytopathogène persiste.

Nos travaux personnels, depuis de nombreuses années (1938-1958 [3 à 8, 22, 23]), nous incitent à penser qu'un grand nombre des faits exposés ci-dessus ne s'expliquent que par des réactions de surface et d'adsorption, dues à l'existence de substances lipoprotidiques, elles-mêmes conditionnées par la capacité de synthèse du germe virulent, la moindre modification des propriétés de surface entraînant d'importants changements dans leur virulence. Nous avons pensé reprendre l'étude physico-chimique du phénomène de pathogénicité sur des bases plus larges.

En bref, d'une part, nos recherches antérieures ayant révélé le rôle de la structure périphérique des Mycobactéries dans l'apparition de la virulence, mais, d'autre part, chaque test d'étude de la couche périphérique ne permettant qu'une appréciation fragmentaire du phénomène, nous avons repris ce travail en utilisant simultanément un ensemble de méthodes physiques, physico-chimiques et biochimiques, permettant une appréciation plus rigoureuse des résultats.

I. — MÉTHODES UTILISÉES

A. LES GERMES :

Nous avons utilisé trois séries de germes.

a) GERMES VIRULENTS. — C'est-à-dire, par exemple, tuant le cobaye de 350 g en six à huit semaines, à la dose de 0,01 mg (par tuberculose généralisée).

Deux types : l'un classique : H37 Rv ; l'autre isolé chez un malade évolutif, souche Paraf catalase-positive, résistante à l'INH.

b) GERMES NATURELS « AVIRULENTS ». — C'est-à-dire ne tuant pas le cobaye (paratuberculeux). Nous avons choisi la souche « Minetti » aimablement fournie par le professeur Penso que nous remercions ici.

c) GERMES ATTÉNUÉS. — Type BCG ou type catalase-négative isolée d'un malade traité par les antibiotiques (souche Paraf catalase-négative, sensible à l'INH).

B. ÉTUDE PHYSIQUE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X.

Tous les diagrammes de diffraction sont exécutés sur un échantillon de 1 mm³ environ, placé dans une petite cuve en pyrex. Les germes sont desséchés à 80 p. 100 environ pour éviter la diffusion des rayons X dans l'eau de capillarité. Les extraits lipidiques sont traités sous vide pour éliminer toute trace de solvant.

La méthode utilisée est classique. Le tube à rayons X à foyer fin 1 mm/0,2 mm est à une anode de cuivre, le rayonnement utilisé est $K\alpha\text{ Cu} = 15\,393\text{ U. \AA}$. Le tube est alimenté sous tension constante 32 Kv/4mA. Les temps de pose varient selon les échantillons, de trois à cinq heures [12].

Le rayonnement traverse un monochromateur à lame de quartz taillé suivant Johannson et ne réfléchissant que $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ du cuivre. L'échantillon est traversé par ce rayonnement. Les raies de diffraction sont localisées sur le film photographique disposé sur un support circulaire de 57,4 mm de diamètre. Chaque raie est nette pour des angles inférieurs à $4\text{ \AA} = 100^\circ$ environ.

Sur le cliché, le diamètre des anneaux mesurés en millimètres est égal à 4-1. 1 degré d'angle est égal à 1 mm sur le cliché.

Le schéma de l'installation est le suivant (V. fig. 1).

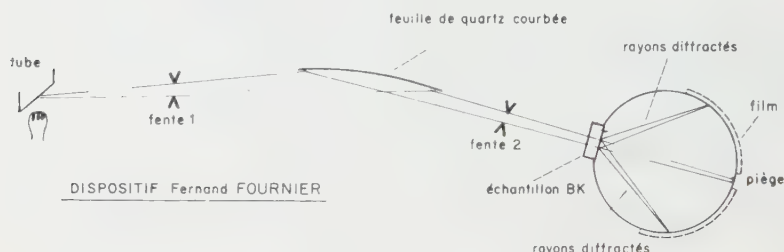


Fig. 1. — Dispositif Fernand Fournier.

C. DÉLIPIDATION FRACTIONNÉE DES GERMES.

Nous avons utilisé une technique inspirée de celle de Macheboeuf (1935) [47] et proche de celle préconisée par Russe et Barclay (1955) [25]. Les germes sont recueillis après culture sur milieu solide de Löwenstein, séchés stérilement entre deux feuilles de papier filtre stérile, puis traités successivement par quatre solvants : 1° Acétone à froid, 2° Ether à froid, 3° Alcool méthylique à froid, 4° Alcool éthylique bouillant.

Chaque opération conduit à l'obtention d'une solution lipidique et d'un résidu. La solution est recueillie dans un récipient placé à l'étuve à 37° jusqu'à évaporation à sec (1). Le résidu bacillaire est l'objet d'un prélèvement en vue de la détermination de tests cytochimiques.

Le traitement par solvant s'opère de la façon suivante :

Le culot bacillaire est placé dans un tube à hémolyse qui est agité mécaniquement à raison de 10 secousses par seconde pendant un temps variable, conformément aux données ci-dessous :

Acétone à froid (température du laboratoire) ...	5 heures
Ether à froid " " ...	5 heures
Alcool méthylique " " ...	5 heures
Alcool éthylique (bouillant)	1 heure

(1) Le terme de l'opération se traduit par l'obtention, soit d'un mélange total des quatre extraits, soit de quatre extraits séparés.

Finalement nous obtenons un résidu microbien ayant subi les quatre lavages successifs précédents, c'est ce que nous appelons : cadavre délipidé.

Un traitement spécial a parfois été fait au résidu bactérien délipidé après la dernière opération. Les résidus lipidiques provenant de chacune des quatre opérations ont été émulsionnés dans un peu d'alcool-éther et d'eau, mis en contact avec le résidu bactérien par agitation pendant vingt minutes environ. Nous avons appelé cette opération : relipidation.

D. DÉSORGANISATION DE LA SURFACE PAR ACTION DE LA TRYPSINE.

Nous avons utilisé des Mycobactéries cultivées sur milieu de Löwenstein. Les germes recueillis aseptiquement étaient lavés par un tampon phosphaté après pesée, puis mis en contact, dans des fioles de 50 cm³, avec une préparation de trypsine en présence d'un tampon phosphaté : pH 7,1 (20 mg de germes pour 5 cm³ de tampon et 100 mg de trypsine). La préparation était placée à l'étuve à 37° pendant cinq heures et agitée pendant soixante secondes toutes les quinze minutes.

Au bout de ce temps les germes étaient recueillis, lavés trois fois à l'eau distillée stérile et soumis à l'action des cyto-tests chimiques.

E. TECHNIQUE ENZYMATIQUE.

a) DÉSHYDROGÉNASE. — Nous utilisons la technique classique de décoloration du dichlorophénol-indophénol en présence d'une solution tampon phosphatée à pH 7, en tube de Thunberg, avec environ 5 mg de culture microbienne. Après une observation de quinze minutes si le liquide n'est pas décoloré, il s'agit d'un germe virulent ; si le liquide est légèrement décoloré, il s'agit d'un germe atténué atypique ; si, enfin, le liquide est complètement décoloré, il s'agit d'un germe avirulent. On peut également noter le temps de décoloration exprimé en minutes.

b) CATALASE. — Nous utilisons soit la méthode volumétrique au moyen de l'appareil de Warburg avec une anse de platine de germes étudiés et 1 cm³ d'H₂O₂ à 1 p. 100 et lecture de la variation manométrique au bout de deux à quatre minutes ; soit la méthode microscopique en examinant le comportement du contenu d'une anse de platine de germes en présence de II à III gouttes d'H₂O₂ au bout de soixante secondes au faible grossissement (libération de bulles gazeuses).

TABLEAU I.

	pH immédiat	4 heures plus tard	24 heures plus tard
Sol. d'urée à 1%	6,8	6,8	6,8
Minetti	6,8	7,2	8,2
H37Rv	6,8	7,4	8,2
BCG	6,8	8	8,2
Sensible INH Paraf —	6,8	7,2	7,8
Résistant INH Paraf +	6,8	8,2	8,2

c) URÉASE. — Nous utilisons la technique de Ferguson modifiée, en mesurant la variation du pH d'une solution d'urée en présence d'un indicateur colorimétrique inactif sur le bacille, le rouge de phénol, au contact des germes étudiés. Le tableau I résume les lectures faites à 37° aux quatrième et vingt-quatrième heures, certaines modifications de pH s'opérant très lentement.

F. TEST CYTO-CHIMIQUE.

Nous avons utilisé le test au bleu de Nil et celui à la turquoise pandurane, l'un et l'autre déjà décrits dans ces *Annales* [5, 7].

II. — RÉSULTATS

PREMIÈRE PARTIE.

Délipidation et rayons X.

Nos résultats portent sur cinq souches différentes : H37Rv virulente (tuant le cobaye), souche Paraf catalase + (tuant le cobaye), souche Paraf catalase — (ne tuant pas le cobaye), BCG, souche Minetti (paratuberculeux, professeur Penso [24]).

Nous avons préparé les diagrammes de rayons X :

a) Pour les germes vivants, tels qu'ils se présentent après culture sur Löwenstein ;

b) Pour les germes délipidés (cadavres bactériens délipidés) ;

c) Pour les germes n'ayant pas subi de traitement de délipidation (c'est-à-dire germes bruts), mais qui sont soumis aux cytotests colorés (bleu de Nil, en particulier) ;

d) Pour les extraits lipidiques (2) [c'est-à-dire les substances extraites au cours de nos lavages].

Ce sont quelques-uns de ces diagrammes que nous présentons ici (pl. I).

Etant donné la structure très complexe des lipides des germes et le peu d'information donnée par les diagrammes de rayons X, nous avons évité des hypothèses fantaisistes et donné les équidistances des plans réticulaires en unités Angström, sans préciser s'il s'agit d'une diffraction par des atomes en motifs moléculaires ou de diffraction par les atomes en réseau cristallin. D'ailleurs, ces deux cas se retrouvent sur un même cliché.

Le tableau II donne les résultats obtenus sur quelques germes et leurs lipides. On peut en déduire ce qui suit :

1° Tous les extraits : BCG, H37Rv, Minetti, catalase —, cata-

(2) Nous remercions particulièrement M. le Dr Bretey, qui nous a aimablement fourni diverses préparations de son laboratoire et qui s'est vivement intéressé à nos travaux, nous apportant de précieux conseils.

lase +, présentent un diagramme de corps cristallisé différant seulement par quelques anneaux ponctués, c'est-à-dire à gros cristaux. La plus grosse différence repose sur l'existence d'anneaux très marqués vers 4,83-4,51 Å, pour les *germes virulents* (H37Rv, souche Paraf cat. +).

TABLEAU II.

SOUCHES	PRODUIT EXAMINÉ	ANALYSE des ANNEAUX de DIFFRACTION X MESURE des ÉQUIDISTANCES en U. Å. (F. Fournier)																	
H37Rv	Germe vivant total					4,33	4,51		4,12										
	Total J.D	9,75				4,63	4,51		4,08		3,12	3,01		2,88	2,71	2,61	2,40	2,2	1,99
	Extrait lipidique																		
	Total I.P. éthéré					5	4						3		2,7				
Catalase + J Paraf	Germe vivant total					4,92	4,52		4,12										
	Extrait lipidique	9,75	6,31			4,92					3,13	3,1		2,97	2,88	2,61	2,48	2,24	1,99
	Total J. Desbordes																		
Catalase J Paraf	Germe vivant total					4,83	4,5		4,12									2,43	
	Extrait lipidique J.D.	9,8				4,83			4,01		3,13			2,97	2,88	2,61	2,59	2,22	1,98
BCG	Germe vivant total	I.P.	9,8	6,8		4,32		4,12	4,04	3,56				2,88	2,71			2,02	
		J.D.	9,6	6,5		4,52		4,12		3,48			2,98	2,92	2,71			2,12	
	Germe délipidé J.D.				4,52		4,13	3,70											1,99
					4,51		4,13	3,63											2,24
	Germe total ayant fixé le bleu de Nil	9,6		5,52				4,02		3,33	3,04	2,97	2,82	2,69	2,61	2,40	2,30		
	Extrait lipidique	Total J.D.	9,75		4,83			4,08	3,36	3,01		2,88	2,71	2,61	2,49	2,40	2,18	1,99	
		Total J.D.	9,8		4,83		4,32			3,14	3,02		2,88	2,71	2,59	2,40	2,22	1,98	
		I.P. éthéré				4,4		4,12			3		2,87	2,70					
		Acétonique J.D.				4,5		4,13	3,63										
	Minetti (Penso)	Germe vivant total	9,75						4,12	4,04			2,92						
9,75								4,1	4			2,97							
Extrait lipidique J.D.		9,75						4,08		3,12	2,97				2,56	2,36	2,2	1,97	

Les chiffres en caractères gras indiquent des anneaux très marqués. Les chiffres en italiques indiquent des anneaux peu marqués ou flous.

Erratum : Deuxième colonne, quatrième ligne. Au lieu de : *Polyvaleur*, lire : *Polyvalent*.

2° Les anneaux des corps bactériens délipidés sont identiques aux germes d'origine, sauf une disparition de certaines raies montrant la perturbation par le solvant, en particulier l'anneau de 4,12 Å supprimé, modifié ou atténué après extraction à froid.

3° Les germes non virulents naturels (Minetti) ne présentent pas d'anneaux caractéristiques vers 4,83-4,51 Å.

4° Les germes atténués (BCG, souche Paraf cat. —) révèlent encore ces anneaux vers 4,83-4,51 Å, mais très atténués.

5° La fixation du bleu de Nil sur les germes semble bien modifier la structure périphérique, la variation portant dans nos conditions expérimentales sur la portion révélée vers 4,83-4,51 Å.

6° Par rapport à nos résultats de 1953 [10], nos clichés actuels révèlent un bien plus grand nombre d'anneaux. Par exemple, pour le BCG, qui, pour l'instant, nous a donné le plus de résultats, nous montrons huit anneaux sur le corps brut et onze anneaux sur les lipides extraits.

DEUXIÈME PARTIE.

Délipidation et tests cyto-chimiques.

Nous utilisons toujours nos cinq souches différentes : H37Rv (tuant le cobaye), souche Paraf catalase + (tuant le cobaye), souche Paraf catalase — (ne tuant pas le cobaye), BCG, souche Minetti (paratuberculeux, professeur Penso).

TABLEAU III.

Manipulations sur es germes	BLEU de NIL					TURQUOISE PANDURANE				
	H37Rv	Cat.+	Cat.—	BCG	Minetti	H37Rv	Cat.+	Cat.—	BCG	Minetti
Avant délipidation	12,5	12	4	0	1	6	3	5	20	11
Après acétone	9	10	4	0	7	9	5	12	17	14
Après éther	7	6,5	0	0	5	10	6	10	12,5	11
Après alcool méthylique	6	6	0	6	0	11,5	5	7	10	10
Après alcool éthylque	2	0	0	9	0	13	8	2	5	9
Après relipidation	10	9	2	5	5	8	6	5	19	12,5

On pratique sur ces souches, avant, pendant et après les délipidations successives, les tests cyto-chimiques.

Voici les résultats :

Figure 2, tableau III (bleu de Nil).

Figure 3, tableau III (turquoise pandurane).

Nos résultats montrent donc bien l'influence de la délipidation sur les couches périphériques. En particulier, au fur et à mesure que l'on a arraché les lipo-protéines, grâce à l'action de solvants polaires, la fixation et la métachromasie des germes virulents s'atténuent et disparaissent même (H37Rv, cat. +), tandis qu'apparaît la réaction particulière de la coloration par les phthalocyanines.

Avec le BCG, un phénomène curieux apparaît, que nous avons du reste eu déjà l'occasion de signaler ailleurs. Alors qu'avec la souche initiale, la fixation métachromatique n'avait pas lieu, les « décapages » successifs par les solvants polaires font finalement apparaître une zone plus profonde pour laquelle le phénomène

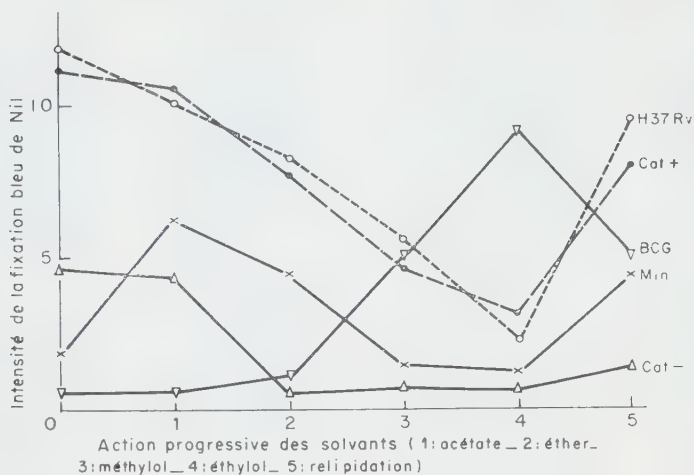


FIG. 2. — Tests cytochimiques après délipidation.

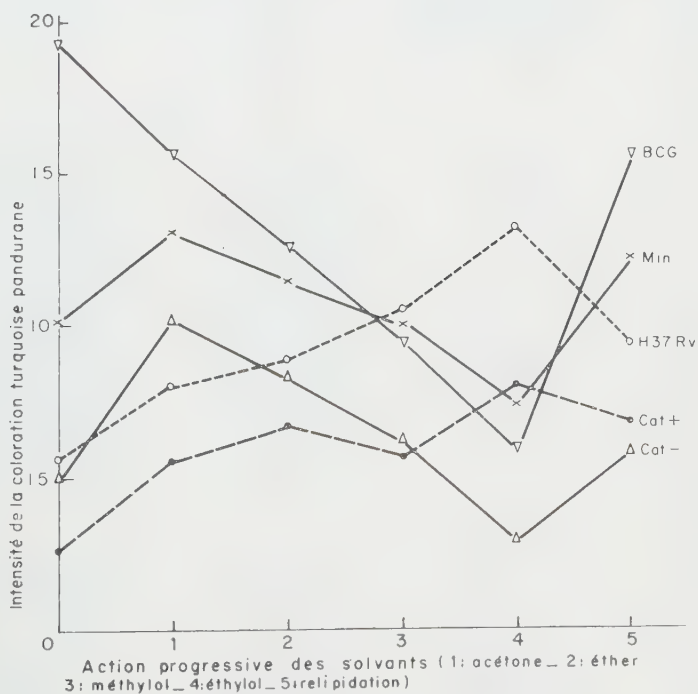
FIG. 2. — *Erratum* : Au lieu de : 1 : acétate, lire : 1 acétone.

FIG. 3. — Turquoise pandurane après délipidation.

de métachromasie devient positif. Au contraire, au cours de ces manœuvres, la réaction phthalocyanique (pandurane) devient négative.

Une différence apparaît avec le germe atténué catalase-négatif, en ce qui concerne la fixation du bleu de Nil et l'action successive des solvants. Dans nos *conditions expérimentales*, on ne dévoile pas de zones profondes donnant la métachromasie positive.

TROISIÈME PARTIE.

Désorganisation trypsique de surface et tests cyto-chimiques.

Là également, nous utilisons nos cinq souches différentes : H37Rv (tuant le cobaye), souche Paraf (catalase +, tuant le cobaye), souche Paraf (catalase —, ne tuant pas le cobaye), BCG, souche Minetti (paratuberculeux, professeur Penso).

LÉGENDE DE LA PLANCHE

CLICHÉ n° 617. — Corps total d'un BCG, provenant de l'Institut Pasteur, aimablement fourni par le Dr Bretey. Noter les anneaux aux longueurs d'onde suivantes, en partant du centre : zone blanche $U. \lambda = 9,8, 6,8, 4,32, 4,12, 4,04, 3,56, 2,88, 2,71$ et $2,02$.

CLICHÉ n° 635. — Extrait éthéré à chaud de BCG aimablement fourni par le Dr Bretey et examiné quatre ou cinq mois après sa fabrication. Noter l'énorme anneau flou (très noir sur le cliché) de $4,4$ à $4,12$ et les anneaux plus fins vers $2,8, 3$ et $2,7$.

CLICHÉ n° 636. — Préparation identique à la précédente (Dr Bretey), mais à partir d'H37 Rv. Noter la différence, en particulier l'anneau gras et net vers 4 , et l'autre très net mais plus fin vers 5 . Deux autres plus fins sont visibles vers 3 et $2,7$.

CLICHÉ n° 679. — Bleu de Nil en cristaux, nombreux anneaux ponctués. Les petits points noirs représentent des condensations moléculaires du colorant.

CLICHÉS n° 677 et n° 678. — Préparation d'un cadavre bactérien de BCG, après extraction acétonique J. Desbordes. Le premier cliché après deux heures, le second après trois heures trente de pose. Noter 3 anneaux bien visibles à $4,51, 4,12$ et le dernier vers $3,6, 3,7$. Comparer avec le cliché n° 617 et noter les différences d'intensité des anneaux et l'impossibilité de relever après délipidation, des diffractions vers $9,6$ et entre 3 et 2 , alors que l'on devine encore un anneau vers $1,9$ et $2,2$.

CLICHÉ n° 674. — Extrait total d'un BCG, par J. Desbordes (mélanges des extraits acétone, éther éthylique et méthylique). Noter les 11 ou 12 anneaux $9,75, 4,83, 4,08, 3,36, 3,01, 2,88, 2,71, 2,61, 2,49, 2,40, 2,18, 1,99$. Noter la disparition de l'anneau $4,12$ que l'on peut supposer être caractéristique des protéines bactériennes (corps bactérien), nettement visible dans le cliché n° 617 ci-dessus. On note bien ici un anneau vers $4,08$ que l'on pourrait assimiler au précédent, mais il est environ 600 fois plus faible.

CLICHÉ n° 637. — Corps bactérien BCG ayant fixé le bleu de Nil (réaction de Desbordes et Fournier). Comparer avec les clichés n° 617 : BCG total tel que, n° 674 : extrait lipidique privé du corps bactérien, n° 679 : bleu de Nil seul, et noter combien l'action du bleu de Nil fait ressortir les lipides périphériques.



N° 617 BCG essoré germe total.



N° 635 BCG extrait à chaud.



N° 636 H37 Rv extrait à chaud.



N° 679 bleu de Nil en cristaux.



N° 677 BCG extrait acétone 2 h. de pose.



N° 678 BCG extrait acétone 3 h. 30 de pose.



N° 674 BCG extraits toluène à froid.



N° 637 BCG coloré bleu de Nil.



On pratique sur ces souches, avant et après l'action de la trypsine, les tests cytochimiques. Nous obtenons les résultats suivants (fig. 4, tableau IV).

Là encore, l'action de désorganisation de la couche périphérique

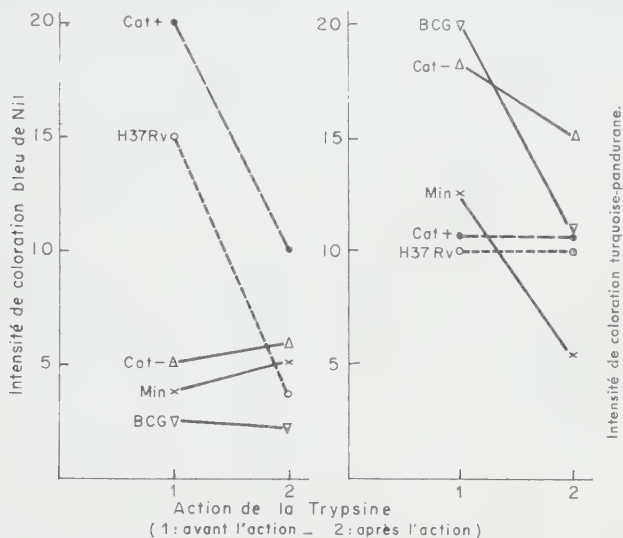


FIG. 4.

TABEAU IV.

ACTION de la TRYPSINE	BLEU de NIL					TURQUOISE PANDURANE				
	H37Rv	Cat.+	Cat.-	BCG	Minetti	H37Rv	Cat.+	Cat.-	BCG	Minetti
Avant	15	20	5	2,5	4	9	10	17	20	12,5
Après	4	9	7	2	6	9	10	14	10	7,5

paraît nette. Sous l'action de l'enzyme, le bleu de Nil ne se fixe plus et la métachromasie disparaît chez les germes virulents (H37Rv, souche Paraf cat. +).

QUATRIÈME PARTIE.

Activité enzymatique des germes.

Nous utilisons toujours notre série de cinq souches différentes : deux virulentes (H37Rv, souche Paraf, cat. +), une avirulente naturelle (Minetti du professeur Penso), deux atténuées artificielles (BCG et souche Paraf, catalase —).

Avant toute action quelconque sur l'intégrité périphérique des germes, l'activité enzymatique observée était la suivante (V. tableau V).

Nous pouvons donc conclure qu'entre nos mains, les germes se présentaient comme doués des propriétés enzymatiques suivantes :

H37Rv : déshydrogénase négative, catalase ++, uréase +.

Souche Paraf, cat. + : déshydrogénase négative, catalase + + +, uréase + +.

BCG : déshydrogénase +, catalase —, uréase —.

Souche Paraf, cat. — : déshydrogénase +, catalase —, uréase —.

Minetti : déshydrogénase +, catalase —, uréase —.

TABLEAU V.

	Déshydrogénase (temps de décoloration en minutes)	Catalase (variation manométrique du Warburg)	Uréase (nombre de points de variation du pH.)
H37Rv	240	50	2,7
Paraf Cat. +	240	60	3,9
BCG	15	5	1,9
Paraf Cat. —	5	3	0,5
Minetti	10	5	1,4

Nous avons étudié ces souches après action de la trypsine et après action des solvants délipidants et nous avons noté les résultats suivants :

1° Sous l'action de la trypsine, le temps de décoloration diminue considérablement, quand il s'agit de germes *virulents* (passage de 240 min. à 40 min., par exemple).

2° Sans pouvoir affirmer que l'activité catalasique diminue, il y a chute de la capacité de dégagement d'oxygène dans le manomètre de l'appareil de Warburg, avec les souches traitées.

3° On n'a pas observé de variations caractéristiques de l'activité uréasique.

4° L'action des solvants, dans nos conditions expérimentales, n'a pas permis de conclusion sur l'équipement enzymatique des germes.

En complément de ces recherches, nous avons pensé qu'il serait peut-être intéressant de savoir si les retentissements métaboliques dus à l'apparition d'une résistance aux antibiotiques ont une incidence quelconque sur les résultats relatifs aux tests cytochimiques. A première vue, il semble que ces tests (tests au rouge neutre et au bleu de Nil) soient peu modifiés. Cependant, nous venons de montrer que les Mycobactéries semblaient être revêtues de couches périphériques de textures différentes, mises en évidence par des lavages successifs à l'acétone, à l'alcool, etc.

Par ailleurs, Russe et Barclay [25] viennent de montrer que les germes cultivés en présence d'INH révélèrent une chute de leur teneur en lipides : 11 p. 100 contre 16 p. 100 chez les témoins. Cette différence portait surtout sur les lipides extractibles par l'alcool méthylique à froid (2 p. 100 contre 3 p. 100).

Nous avons entrepris l'étude du comportement des germes isolés de quelque 300 malades examinés au Centre Hospitalier E.-Roux depuis deux ans, vis-à-vis du test au bleu de Nil. Ces germes étaient tous testés du point de vue activité uréasique et catalasique en suivant les techniques précédemment décrites.

1° *Pouvoir uréasique et réaction au bleu de Nil.* — Nous n'avons pas constaté de rapprochement possible entre l'intensité de la réaction à l'uréase et le test du bleu de Nil. Presque tous les germes, quelle que soit leur sensibilité ou leur résistance à l'INH ou à la streptomycine, gardaient une forte colorabilité des lipides acides, après un seul lavage à l'alcool-éther, et une réaction pathogène indéniable sur le cobaye.

Ceux qui avaient une réaction négative au bleu de Nil après un seul lavage (liée à une inertie nette vis-à-vis du cobaye aux doses usuelles) se partageaient par moitié entre germes uréase + et germes uréase —.

2° *Pouvoir catalasique et réaction au bleu de Nil.* — Sur 150 souches, nous n'avons trouvé aucun cas de germes, ayant perdu à la fois leur activité catalasique et leur colorabilité par le bleu de Nil après un seul lavage à l'alcool-éther à froid. Ces germes, bien que catalase —, ont cependant toujours déterminé des lésions au point d'inoculation (le plus souvent minimales, il est vrai). Cette persistance de l'équipement périphérique, mise en évidence avec un unique lavage alcool-éther, que nous considérons comme essentielle aux manifestations pathogènes (alors que les effets pathologiques sont moindres avec les germes catalase —), mérite d'être soulignée.

A l'inverse, nous avons constaté l'existence de germes ayant perdu tout ou partie de leur colorabilité au bleu de Nil après un seul lavage (avec une chute ou une disparition de leur aptitude pathogène pour le cobaye) et qui était doués d'une activité catalasique marquée.

Le test au bleu de Nil avec un seul lavage à l'alcool-éther à froid semble donc insuffisant pour rendre compte des altérations possibles des Mycobactéries isolées des produits pathologiques provenant de malades soumis à une thérapeutique prolongée.

Nous nous proposons de poursuivre cette étude en appliquant la technique des lavages multiples par les solvants classiques des lipides.

DISCUSSION.

Nos résultats, dans l'état actuel de nos recherches, semblent nous autoriser à tenter une appréciation de la structure périphérique des Mycobactéries et à dissocier trois états différents :

- a) Structure particulière des germes naturels *avirulents*,
- b) Structure des germes *virulents*,
- c) Structure artificielle des germes *atténués*.

I. SOUCHES VIRULENTES. — Ce sont les souches qui contiennent des bacilles avides de sources nutritives lipidiques (exigence particulière pour les milieux de culture *in vitro* : lipides d'œufs, pomme de terre, glycérine, etc.) douées d'un intense pouvoir agressif pour les cellules des animaux récepteurs (cobaye en particulier).

Ces germes fixent énergiquement les colorants basiques de la série des azines (rouge neutre, bleu de Nil), présentent le phénomène de métachromasie avec ces colorants, signant la présence de lipoprotides périphériques lourds en polarités négatives. Ils sont dotés d'un équipement enzymatique très riche. Par diffraction des rayons X, ils font apparaître des anneaux caractéristiques, mais ces lipides peuvent être arrachés par lavages doux (à froid) des solvants polaires classiques. Dans ce cas, la réaction précédente des colorants basiques devient négative. La structure aux rayons X révèle une perturbation portant surtout sur la portion lipoprotidique. Celle-ci semble disparaître tandis que naissent tout une série d'anneaux signant sans doute la libération de certains corps sortis du cénapse originel.

II. SOUCHES NATURELLES AVIRULENTES. — Ces souches sont souvent moins exigeantes au point de vue nutritif *in vitro* : milieu moins riche, pousse plus rapide, et surtout ces bacilles sont bien moins agressifs pour la cellule de l'hôte : par exemple, ils ne tuent pas le cobaye. L'analyse de la couche périphérique à l'aide de moyens aussi divers que l'examen de la diffraction des rayons X ou l'étude de la métachromasie avec les colorants basiques révèle des résultats identiques : richesse moins grande en lipoprotides à polarité négative. En particulier, les anneaux caractéristiques à $\lambda = 4,8$ à $4,5$ Å semblent manquer systématiquement. Cependant, il s'agit toujours de germes possédant une certaine richesse en cénapses (visibles sans doute vers $4,12$ Å). A signaler que les délipidations successives, tout au moins dans nos conditions expérimentales, ne révèlent pas de zone profonde manifestant une métachromasie positive avec le bleu de Nil, par exemple.

Les germes, naturellement avirulents, semblent donc assez homogènes au point de vue structure périphérique.

III. SOUCHES ATTÉNUÉES. — Le problème de la connaissance de la structure périphérique des souches *atténuées*, dans des conditions s'écartant plus ou moins des moyens naturels, nous apparaît beaucoup plus complexe. Nous pensons même qu'il est loin d'être connu, et que les résultats que nous apportons ici doivent être considérés comme fragmentaires. Cependant, nous avons pris deux exemples de telles souches : l'une qui peut être considérée comme fixée dans sa descendance : le BCG ; l'autre, qui ne peut être que vue sous l'angle d'une évolution non stabilisée : le germe

catalase-négatif (souche Paraf, cat. —) isolé à partir d'un malade soumis aux antibiotiques.

De telles souches présentent des résultats qui ne sont pas superposables, la différence essentielle portant à nos yeux sur la variation de la structure *la moins périphérique*. A la périphérie même, il paraît incontestable, tout au moins dans nos conditions expérimentales, que la densité en lipoprotides à polarité fortement négative est faible dans les deux cas, *mais il existe des couches plus profondes qui semblent différentes*. Par exemple, le BCG est encore riche en cénapses lipoprotidiques, gardant une structure géométrique fortement organisée et de polarité négative nette. Par la méthode de diffraction des rayons X, on note la présence, quoique faible et atténuée des anneaux du type $\text{\AA} = 4,8$ à $4,5$ environ.

Quels que soient la richesse du milieu de culture offert ou le passage à l'animal, de telles caractéristiques, tout au moins entre nos mains, ne semblent pas susceptibles de variation.

Par contre, les résultats sont discordants avec une souche telle que la catalase — Paraf, discordance vraisemblablement en rapport avec la richesse du milieu offert, le passage ou non sur l'animal, et même la dégénérescence à la suite de divers passages sur milieux *in vitro*. La mise en évidence de couches profondes, soit par lavages par solvants polaires, soit par désorganisation trypsique, ne révèle pas systématiquement des substances à haute polarité négative, mais le plus souvent des corps inertes à ce point de vue.

A ce sujet, nous ne pouvons mieux faire que de rappeler nos conclusions de Rome, que les expériences rapportées ici nous paraissent confirmer [10].

Plus cette zone périphérique des bacilles est chargée en lipides (de constitution telle que leurs forces physiques sont intenses), plus elle est cohérente et plus grande est la virulence.

Mais celle-ci sera faible si la zone externe présente un minimum de cohésion par suite d'une teneur plus faible en lipides.

La virulence n'existera pas chaque fois que le bacille sera dans l'impossibilité matérielle de synthétiser ces lipides en quantité suffisante, soit qu'il ne puisse trouver les matériaux nécessaires (cas de bacilles poussant sur milieux trop pauvres), soit qu'il ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire (par suite de son inexistence génétique ou par suite de perte accidentelle, passagère ou définitive).

Mais comme toujours, cette virulence doit être considérée par rapport à l'hôte. Si la zone périphérique résiste mal et disparaît plus ou moins sous l'action des défenses de l'organisme parasité, la virulence s'estompe. C'est ce qui explique les variations de virulence des germes vis-à-vis de certains animaux. On conçoit,

en outre, que cette couche lipidique ne puisse se former pleinement qu'au moment de la maturité physiologique des germes, ce qui explique la faiblesse, voire l'absence de la virulence des bactéries jeunes (Nègre et Bretey) [21].

Mais nos tests cytochimiques nous renseignent, eux, sur l'existence de la zone périphérique, témoin certain d'une virulence possible. Si cette zone est présente dans le germe testé (test + + +) il y a possibilité d'une virulence pour tout hôte réceptif (virulence virtuelle). A moins de cas exceptionnels, existence chez le récepteur d'estérases très actives par exemple ou de substances capables de modifier les forces de surface par adsorption ou tout autre moyen, l'animal infecté par ce même germe sera l'objet d'une maladie progressive et mortelle.

Dans le cas de bacilles à réactions cytochimiques négatives, il faut cependant distinguer ceux qui n'ont pas et ne peuvent avoir une zone périphérique lipidique, de ceux qui, *momentanément*, ne présentent pas une telle zone, mais *ont gardé le pouvoir d'en reconstituer une* dès qu'ils seront placés dans des circonstances physiologiques différentes (Hauduroy : bacille avirulent descendant d'une Mycobactérie de virulence normale, mais « ayant gardé le souvenir de son passé » [13]).

CONCLUSIONS.

Au stade actuel de nos connaissances, on peut donc dire qu'en utilisant un ensemble de méthodes physiques, physico-chimiques et biochimiques pour tenter d'approcher une certaine connaissance de la structure des Mycobactéries, les résultats concordent. On doit distinguer, en gros, trois sortes de structure.

1° Pour les souches virulentes : richesse certaine en lipoprotides périphériques, riches en polarité négative, riches en anneaux de diffraction des rayons X, dont certains paraissent spécifiques ($\text{\AA} = 4,8$ à $4,5$ environ) susceptible de disparaître ou d'être déplacés et modifiés par lavages successifs par solvants polaires ou par action d'agents enzymatiques, tels la trypsine.

2° Pour les germes avirulents *naturels*, structure lipoprotidique périphérique modifiée par rapport aux précédents, pauvreté en polarités négatives soulignée par l'absence de certains anneaux de diffraction des rayons X, et une certaine inertie en face d'agents enzymatiques, tels que la trypsine.

3° Pour les germes *atténués*, divers cas peuvent se présenter, portant surtout sur la conservation ou non de couches lipoprotidiques *profondes*, la structure périphérique étant le siège de variations *d'intensité* dans la structure géométrique organisée. En particulier, si la diffraction des rayons X souligne souvent la pré-

sence des anneaux révélateurs des souches virulentes, ceux-ci sont très atténués et les complexes lipoprotidiques sont particulièrement dissociables sous l'action, même légère, de solvants des lipides ou de certains enzymes (trypsine).

RÉSUMÉ.

Avec les souches *virulentes*, les méthodes *concordent* : nombreux anneaux de diffraction X, dont un certain nombre absolument nouveaux grâce à nos nouvelles méthodes et non encore signalés ; richesse en lipoprotides périphériques, riches en polarités négatives ; disparition par lavages successifs des réactions métachromatiques et apparition de réactions de coloration aux phthalocyanines.

Avec les germes naturels *avirulents*, les méthodes *concordent* : très peu d'anneaux de diffraction X ; pauvreté en lipoprotides périphériques.

Avec les germes *atténués*, les résultats peuvent être *discordants* : disparition d'une partie seulement des anneaux de diffraction ; conservation de couches lipoprotidiques profondes plus ou moins riches, gardant une structure géométrique organisée, fixant certains colorants métachromatiques tels que le bleu de Nil (contrôle par diagramme de rayons X), le phénomène étant en opposition avec l'observation des couches superficielles pauvres en lipoprotides fixant mal le bleu de Nil.

SUMMARY

STUDY OF THE PERIPHERAL STRUCTURE OF MYCOBACTERIA.

With *virulent* strains, the results of different methods are in good agreement : numerous X-ray diffraction rings, some of them demonstrated for the first time by means of the authors' new techniques ; abundant peripheral lipoprotides possessing numerous negative polarities ; disappearance, after successive washings, of metachromatic reactions, and appearance of staining by phthalocyanin.

With naturally *avirulent* germs, the results of different methods are also in good agreement : very few X-ray diffractions rings, very few peripheral lipoprotides.

With *attenuated* germs, the results may disagree : disappearance of some of the diffraction rings only, persistence of deep, more or less rich lipoprotidic layers, possessing geometric organized structures, binding certain metachromatic stains such as blue Nile stain, whereas the superficial layers contain few lipoprotides and do not easily bind blue Nile stain.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASSELINEAU (J.). *Progrès exp. Tub.*, vol. V, Berkhauser, édit., Bâle, 1951.
 - [2] ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 492.
 - [3] DESBORDES (J.) et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1952, **66**, 382.
 - [4] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 713.
 - [5] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **83**, 809.
 - [6] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Pharmac.*, 1954, **12**, 361.
 - [7] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 584.
 - [8] DESBORDES (J.) et coll. *Résumés du VII^e Congrès Int. Microb.*, Stockholm 1958, n° 7, C.
 - [9] DESBORDES (J.). *Diagnostic bactériologique des Myobactéries*, Masson édit., Paris, 1951.
 - [10] DESBORDES (J.). *Atti del VII^e Congrès Intern. Microb.*, Rome 1953, **4** (Sez XII) p. 285.
 - [11] DUBOS (J.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 73.
 - [12] FOURNIER (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 339.
 - [13] HAUDUROY (P.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1034.
 - [14] KOCH (R.). *Deut. med. Wschr.*, 1897, **23**, 209.
 - [15] LEDERER (E.). *II^e Congrès Intern. Biochem. Symp. Métab. Microb.*, Paris 1952, p. 5.
 - [16] LEDERER (E.). *Exposés annuels de Biochem. méd.*, 20^e série, Masson édit., Paris 1958.
 - [17] MACHEBOEUF (M.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **54**, 71.
 - [18] MIDDLEBROOK (G.) et coll. *Science*, 1953, **118**, 297.
 - [19] MIDDLEBROOK (G.) et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
 - [20] MIDDLEBROOK (G.) et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 852.
 - [21] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 681.
 - [22] PARAF (J.) et coll. *Rec. Trav. Inst. Nation. Hyg.*, 1948, **3**, 519.
 - [23] PARAF (J.) et coll. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **276**, 373.
 - [24] PENSO (G.) et coll. *Rendic. Ist. Sup. Sanita*, Rome 1952, **15**, 491.
 - [25] RUSSE (H.) et BARCLAY (W.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 713.
-

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LES ANTIGÈNES SOLUBLES DU BACILLE TUBERCULEUX

II. — ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DE DEUX POLYSACCHARIDES PRÉSENTS DANS LES FILTRATS DE CULTURE DU BACILLE TUBERCULEUX

par P. BURTIN (*)

(avec l'aide technique de M^{me} J. URIEL et M^{lle} Th. TERNYNCK).

(Centre d'Immunopathologie de l'Association Claude-Bernard,
Hôpital Saint-Antoine, Paris)

Parmi les antigènes décelés dans les filtrats de culture de bacilles tuberculeux se trouvent deux polysaccharides [5]. L'un présent dans la fraction I de la tuberculine IP48, correspondant au principal constituant de l'hémosensitine α de Sorkin et Boyden [23], est probablement identique au polysaccharide I de Seibert [22]; nous le désignons donc sous le nom de polysaccharide I. L'autre provient de l'hydrolyse d'un lipopolysaccharide; pour compléter la nomenclature de Seibert, nous proposons de l'appeler polysaccharide III. Une étude plus complète des réactions immuno-chimiques de ces deux constituants nous a paru nécessaire. Elle a été motivée au départ par le fait qu'en travaillant avec la méthode d'Ouchterlony [21], il nous a paru très difficile d'obtenir un croisement de leurs lignes de précipitation, si bien que nous avons été amené à évoquer une parenté immuno-chimique de ces deux polysaccharides.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — MATÉRIEL.

1° Nous avons surtout utilisé dans cette étude des polysaccharides purifiés.

a) *Polysaccharide I.* — a) Quatre échantillons du polysaccharide correspondant à la fraction I de la tuberculine IP48 [17 a et b], obtenus à partir de quatre souches différentes. Cette frac-

(*) Manuscrit reçu le 13 mars 1959.

tion I a été obtenue par précipitation par 9 p. 100 d'alcool de la fraction de la tuberculine IP48 soluble dans le phénol [17 b].

β) Un échantillon d'hémossensitine α de Sorkin et Boyden [23].

b) *Polysaccharide III.* — α) Le polysaccharide obtenu par hydrolyse du lipopolysaccharide PMKO de Choucroun [7].

β) Le polysaccharide des cires D préparé par Asselineau et Lederer [3] à partir de trois souches différentes de bacilles tuberculeux : Test, H37Ra, Canetti. Celui de la souche Test a été également utilisé après élimination par hydrolyse du peptide qui entre normalement dans sa constitution.

2° Les immunosérums de lapins immunisés avec des bacilles tuberculeux et les globulines préparées à partir de ces immunosérums sont ceux qui ont été décrits dans l'article précédent [5].

B. — MÉTHODES.

1° *Méthodes quantitatives de précipitation en milieu liquide.* — Nous avons utilisé la technique classique de Heidelberger et Kendall [12]. A des volumes constants d'immunosérum ont été ajoutées des quantités croissantes de 8 à 200 μ g d'antigène polysaccharidique. Après une heure d'incubation à 37° C, les tubes ont été laissés quarante-huit heures à la glacière. Les précipités ont été ensuite centrifugés à froid, lavés deux fois avec une solution saline physiologique glacée, puis dissous directement dans 5 ml de réactif du biuret préparé selon Gornall [8]. Les colorations obtenues ont été lues, après une demi-heure d'attente, au photomètre Zeiss, avec un filtre ayant un maximum d'absorption à 546 $m\mu$, une solution de sérumbumaine humaine servant de référence.

Les liquides surnageant ces précipités ont été éprouvés selon la technique du disque (ring-test) avec d'une part le sérum entier, d'autre part une solution diluée d'antigène, ou de l'autre polysaccharide.

Pour l'épuisement des immunosérums, nous avons eu recours aux polysaccharides eux-mêmes, en utilisant une quantité identique ou légèrement supérieure à celle correspondant au point d'équivalence. Les tubes ont été incubés une heure à 37° et quarante-huit heures à la glacière, puis centrifugés. Les surnageants ont servi à de nouvelles réactions de précipitation.

Nous avons essayé l'inhibition des immunosérums par des sucres simples. Nous avons employé le D-mannose, le D-galactose, le L-rhamnose et l'arabinose (D + L) en quantités allant de 10 à 100 mg de sucre pour 1 ml d'immunosérum. Après quatre à vingt-quatre heures d'incubation, les polysaccharides ont été ajoutés en quantités de peu inférieures à celles correspondant au point d'équivalence. Il est à noter qu'en présence de grandes quantités de sucre simple, les précipités spécifiques ne se redissolvent que lentement dans le réactif du biuret, en laissant parfois un résidu non protéique qu'il faut éliminer pour avoir des lectures correctes.

2° *Méthodes de précipitation en milieu gélifié.* — La méthode d'Ouchterlony [24] a été ici la plus souvent utilisée. Nous avons employé une gélose à 1,5 p. 100 contenant 8,5 p. 1 000 de NaCl et 1 p. 10 000 de merthiolate de Na, coulée dans des boîtes de Petri. Les systèmes les plus usuels ont comporté trois réservoirs : un pour l'antisérum, deux pour les antigènes, ou inversement. Les boîtes ont été gardées à la température du laboratoire, protégées de l'évaporation, jusqu'à ce que les réactions de précipitation soient considérées comme terminées, soit trois à dix jours. Elles ont été ensuite photographiées par contact direct, parfois colorées selon la méthode de Uriel et Grabar [27].

L'analyse immuno-électrophorétique [9] a donné elle aussi des renseignements importants. Elle a été utilisée comme indiqué dans l'article précédent [5] : gélose à 1,5 p. 100 contenant un tampon de véronal pH 8,2, force ionique 0,025, coulée sur des plaques de verre de 9×12 cm ; électrophorèse durant une heure trois quarts à deux heures, avec un voltage d'environ 5 volts/cm de gélose.

RÉSULTATS

Les polysaccharides ont des propriétés communes que nous étudierons d'abord. Nous détaillerons ensuite leurs relations immunochimiques.

I. — LES PROPRIÉTÉS COMMUNES DES POLYSACCHARIDES.

1° Les courbes de précipitation qu'ils donnent avec les antisérums correspondants sont de même type : elles comprennent une portion ascendante d'abord régulière puis de pente décroissante, ensuite un plateau qui se prolonge très loin. Il est très difficile de redissoudre le précipité en excès d'antigène. Quelquefois la portion ascendante est très longue : c'est dans ces cas tout particulièrement que l'écart est grand entre les quantités d'antigène correspondant l'une au point d'équivalence, l'autre au maximum de précipité.

La détermination du point d'équivalence est facile quand il s'agit du polysaccharide III. Par contre, le polysaccharide I contient dans tous ses échantillons une impureté, à laquelle correspondent des anticorps dans presque tous les immunosérum (fig. 3). Ce deuxième système antigène-anticorps, quantitativement peu important, rend souvent impossible la détermination du point d'équivalence.

Le rapport anticorps-antigène est variable selon les immunosérums, ainsi qu'on le verra plus loin. Il est toujours beaucoup plus élevé pour le polysaccharide III que pour le polysaccharide I. Si l'on prend comme poids moléculaire 160 000 pour les anti-

corps de lapin et 8 000 pour les polysaccharides (1), on peut calculer qu'au point d'équivalence les rapports moléculaires anticorps-antigène sont de 1,5 à 2,5 lorsqu'on utilise comme antigène le polysaccharide III, toujours inférieur à 1 avec le polysaccharide I. Ces rapports varient peu tout au long de la portion ascendante de la courbe de précipitation : par exemple, les valeurs obtenues avec le sérum T360 et le polysaccharide III sont de 2,50 au début de la courbe de précipitation, de 2,25 à l'équivalence.

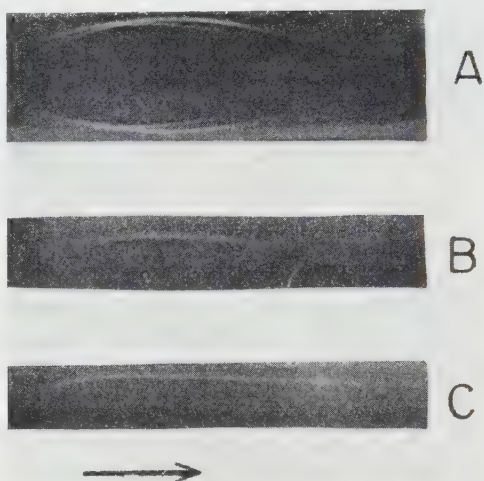


FIG. 1. — Analyses immuno-électrophorétiques : A) d'un autolysat de bacilles tuberculeux de souche humaine, mis à réagir avec les anticorps contenus dans deux préparations globuliniques différentes. Seuls les traits de précipitation des polysaccharides I et III sont visibles, car seule la partie lente du diagramme a été retenue. B) du polysaccharide I. C) du polysaccharide III.

2° Etudiés en milieu gélifié par la méthode de double diffusion, ces polysaccharides donnent chacun un seul trait de précipitation (compte tenu de l'impureté du polysaccharide I) dont la place varie, mais est toujours proche du réservoir d'anticorps, d'autant plus proche que la quantité d'antigène est plus grande (fig. 2 et 3). En même temps que sa position se déplace ainsi, la ligne

(1) Ce chiffre représente à peu près la moyenne de ceux indiqués par Seibert [22], Stacey [24], Tennent et Watson [26], etc., c'est pourquoi nous l'utilisons. Cependant, il faut signaler qu'Asselineau et Lederer [3] ont trouvé des chiffres plus élevés, et variables selon les souches, pour le polysaccharide III (il en résulterait, en ce qui concerne ce polysaccharide, des rapports de combinaison anticorps-antigènes encore plus élevés).

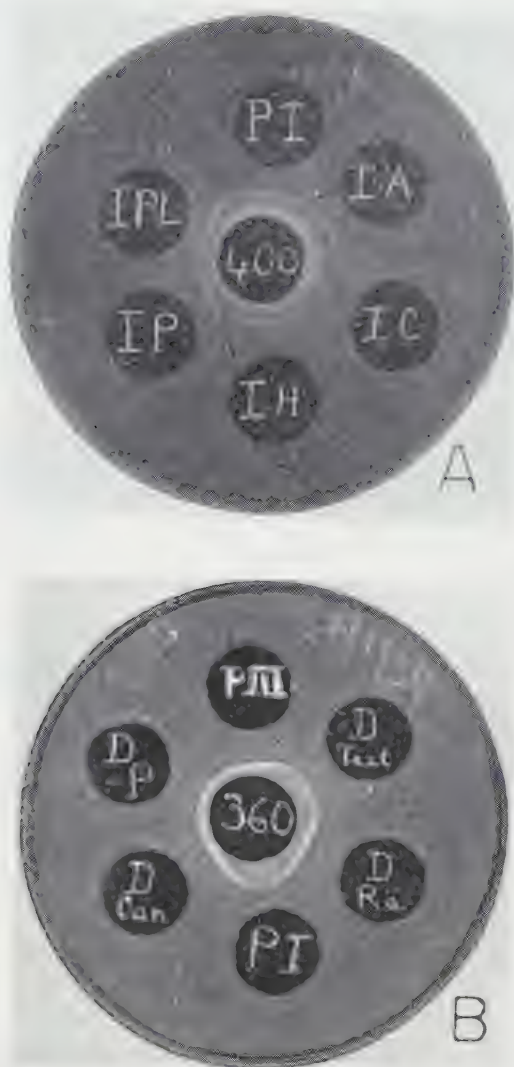


FIG. 2. — Comparaison des polysaccharides de différentes souches de bacilles tuberculeux : A) au centre : immunsérum T400 ; à la périphérie : polysaccharides I de référence (PI) et échantillons de polysaccharides I de 5 souches différentes (IA, IC, IH, IP, IPL). B) à la périphérie : PI (polysaccharide I) ; PIII (polysaccharide III obtenu à partir du PMKO). D Test, D Ra, D can : polysaccharides extraits des cires D (respectivement souches Test, H37Ra, Canetti). D — P : polysaccharide des cires D privé de son peptide. Tous les polysaccharides sont utilisés à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.

de précipitation prend une densité accrue. Il est très rare d'observer sa redissolution, et seulement pour des quantités d'antigènes considérables.

3° Par analyse immuno-électrophorétique (fig. 1), les deux polysaccharides donnent chacun, nous l'avons vu [5], une ligne de précipitation très allongée. L'étendue de cette ligne de précipitation dépend de la quantité d'antigène mise dans le réservoir de départ. Mais la concentration de ces constituants ne semble pas influencer sur leur mobilité, pas plus que leur mélange.

4° L'origine de ces polysaccharides n'a pas d'influence sur leur réactivité immunochimique. Par la méthode d'Ouchterlony, on observe une réaction d'identité entre les polysaccharides provenant de filtrats de culture de bacilles humains, bovins ou de BCG, ainsi qu'entre les polysaccharides de différentes souches humaines (fig. 2, A).

De plus un polysaccharide extrait des cires D et privé de son peptide constitutif a donné une réaction d'identité avec le même polysaccharide intact, ainsi qu'avec ceux provenant d'autres souches (fig. 2, B).

II. — LES RAPPORTS IMMUNOCHEMQUES DES DEUX POLYSACCHARIDES.

La réactivité immunochimique des deux polysaccharides dépend des immunosérums employés, que ce soit en milieu liquide ou en milieu gélifié.

1° Certains immunosérums ne précipitent qu'un seul des deux polysaccharides en milieu liquide (tableau I) comme en milieu gélifié (fig. 2 A). La quantité de précipité obtenue avec eux est assez faible, plus faible que celle donnée par d'autres immunosérums à réactivité plus étendue. Les quantités de précipité sont moins grandes avec le polysaccharide I qu'avec le polysaccha-

TABLEAU I. — Précipitation d'immunosérums avec les polysaccharides I et III.

T 347				T 366			
Polysaccharide I		Polysaccharide III		Polysaccharide I		Polysaccharide III	
Ag ajouté (en μ g)	Ppté obtenu (en μ g protéines)	Ag ajouté	Ppté obt.	Ag ajouté	Ppté obt.	Ag ajouté	Ppté obt.
10	130	AUCUNE	PRECIPITATION	AUCUNE	PRECIPITATION	8	280
20	220					20	490
30	270					30	650
40	290	PRECIPITATION		PRECIPITATION		40	630
50	320					50	730
70	320					62,5	690
100	310					75	700
						100	640

ride III. Le rapport moléculaire anticorps-antigène s'est montré être à l'équivalence de 1 pour le polysaccharide III (sérum T368), de 0,3 pour le polysaccharide I (sérum T347).

2° D'autres immunsérums réagissent avec les deux polysaccharides, mais de manière inégale.

a) Certains (T360) donnent une plus grande quantité de précipité avec le polysaccharide III qu'avec le polysaccharide I (tableau II). Après épuisement par le polysaccharide I, ils précipitent avec le polysaccharide III, mais beaucoup moins abondamment qu'avant l'absorption. Par contre, l'épuisement par le polysaccharide III fait disparaître tous les anticorps capables de réagir avec le polysaccharide I.

TABLEAU II. — Précipitation de l'immunsérum T360 avec les polysaccharides I et III.

T 360 entier				T 360(préalablement absorbé par Poly. III)+ Poly I		T 360(préalablement absorbé par Poly I) + Poly III	
Polysaccharide I		Polysaccharide III					
Ag ajouté (en μ g)	Ppté obt. (en μ g protéines)	Ag.ajouté	Ppté obt.	Ag.ajouté	Ppté obt.	Ag ajouté	Ppté obt.
10	190	4	210	AUCUNE PRÉCIPITATION		30	270
20	360	10	370			50	140
30	420	12	560				
40	450	16	680				
50	470	20	620				
60	410	30	1150				
80	450	35	1110				
100	310	40	1150				
150	300	50	1200				
		70	1170				

En boîte d'Ouchterlony, on observe, avec ces immunsérums, une réaction croisée où le polysaccharide III est l'antigène homologue ou complet, le polysaccharide I l'antigène hétérologue ou incomplet (pl., fig. B). L'immunsérum absorbé par le polysaccharide I donne encore un trait de précipitation avec le polysaccharide III.

TABLEAU II bis. — Précipitation de l'immunsérum T106 avec les polysaccharides I et III.

T 106 entier				T 106(préalablement absorbé par Poly. III) + Poly I		T 106(préalablement absorbé par Poly I) + Poly III	
Polysaccharide I		Polysaccharide III					
Ag ajouté (en μ g)	Ppté obt. (en μ g protéines)	Ag ajouté	Ppté obt.	Ag ajouté	Ppté obt.	Ag ajouté	Ppté obt.
10	240	10	410	20	120	AUCUNE PRÉCIPITATION	
20	320	20	580	40	270		
40	420	30	690	75	430		
50	550	40	700	100	550		
75	680	50	680				
100	580	75	680				
150	710						

b) Les phénomènes sont à peu près inversés pour d'autres immunosérums (T106). La quantité de précipité obtenue avec chaque polysaccharide est du même ordre (tableau II bis). Mais l'absorption par le polysaccharide III laisse subsister des anticorps précipitants avec le polysaccharide I, alors qu'après épuisement par le polysaccharide I, aucune réaction ne se produit avec le polysaccharide III.

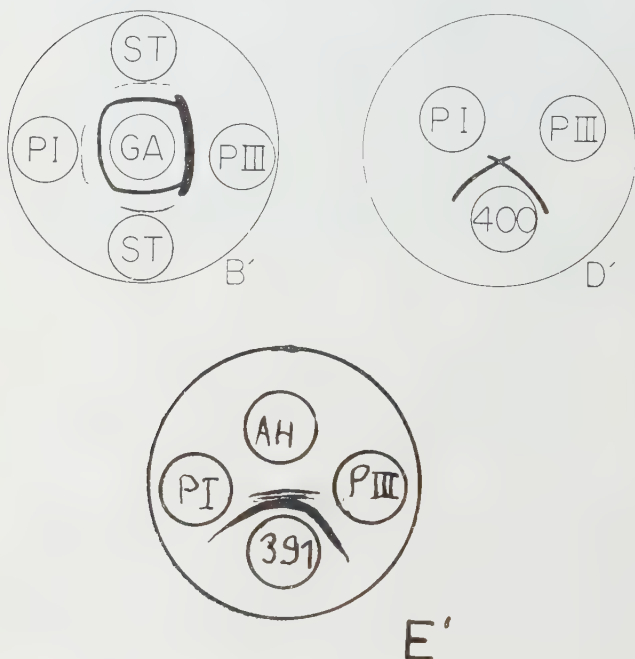
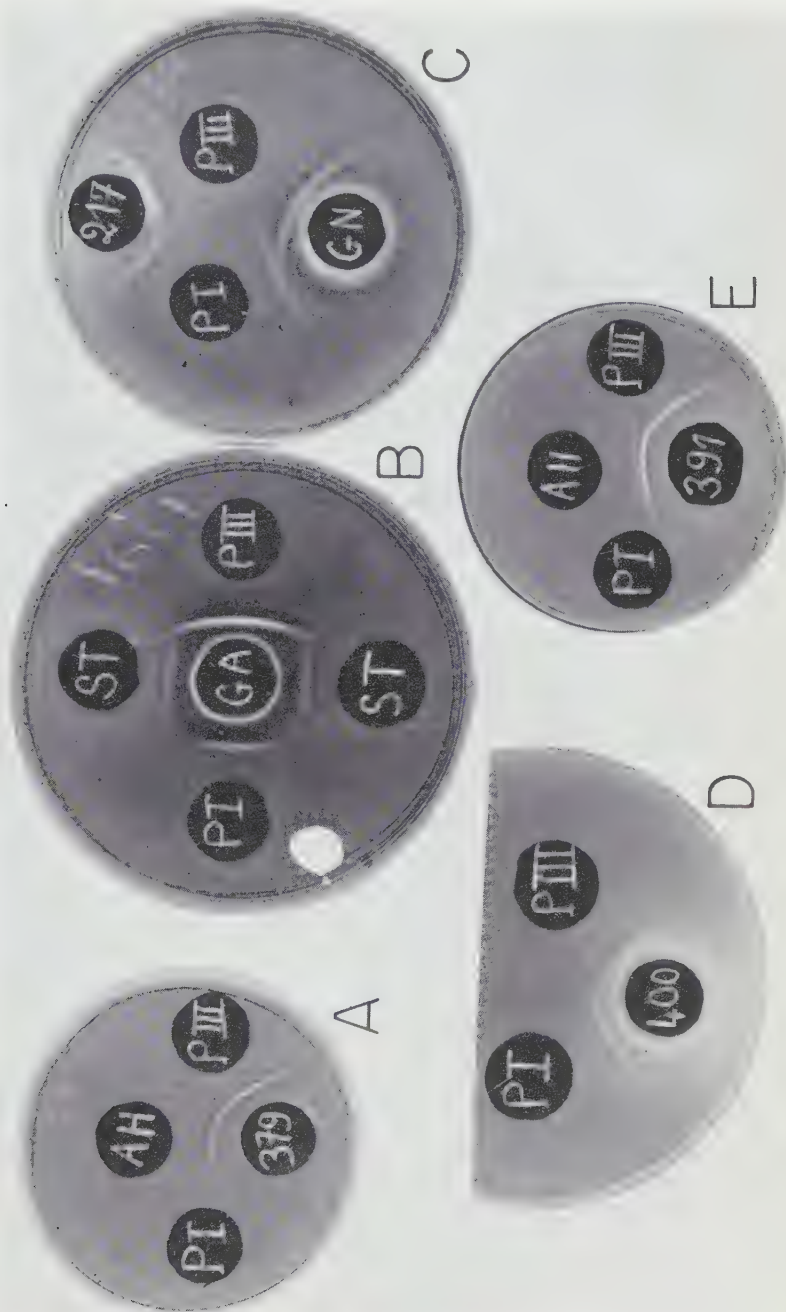


Schéma des fig. B, D et E de la planche.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Comparaison des polysaccharides I et III (PI et PIII) et d'un autolysat de bacilles tuberculeux de souche humaine (AH), vis-à-vis de différents immunosérums. — A) immunosérum T 379, ne réagissant qu'avec le P III. — B) (figure) et B' (schéma) : au centre : GA = globulines A. ST : polysaccharide ST de l'Institut Pasteur employé pour l'hémagglutination passive. On voit nettement l'impureté antigénique du polysaccharide I. — C) immunosérum T 217 et globulines N. — D) (figure) et D' (schéma) : immunosérum T 400. — E) immunosérum T 391. Dans toutes ces figures, les polysaccharides sont employés à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.



En milieu gélifié, les phénomènes sont aussi nets : réaction croisée où le polysaccharide I est l'antigène homologue (pl., fig. C), persistance d'un trait de précipitation avec le polysaccharide I après absorption de l'immunsérum par le polysaccharide III.

La quantité de précipité donnée par les immunsérums des groupes *a* et *b* est relativement grande et les rapports moléculaires anticorps-antigène sont assez élevés au point d'équivalence en ce qui concerne le polysaccharide III (2,25 avec l'immunsérum T360), toujours bas en ce qui concerne le polysaccharide I (0,5 avec l'immunsérum T106).

c) Avec de rares immunsérums (T105, T400) ou préparations globuliniques, on a une quantité de précipité assez importante avec les deux polysaccharides (tableau III). Surtout l'absorption par l'un d'entre eux laisse subsister des anticorps précipitants avec l'autre, quel que soit le sens de l'épuisement.

TABLEAU III. — Précipitation de l'immunsérum T105 avec les polysaccharides I et III.

T 105 entier				T 105 (préalablement absorbé par Poly. III) + Poly I		T 105 (préalablement absorbé par Poly I) + Poly III	
Ag ajouté (en μ g)	Ppté obt (en μ g protéines)	Ag ajouté	Ppté obt	Ag ajouté	Ppté obt	Ag ajouté	Ppté obt
10	290	10	490	50	140	30	230
30	420	30	870	75	360	75	450
50	480	50	850				
75	660	75	1070				
100	770	100	1420				

En milieu gélifié, on observe un croisement des lignes de précipitation données par les deux polysaccharides. Ce croisement est moins net en boîte d'Ouchterlony (pl., fig. D et schéma, fig. D') que sur un diagramme immuno électrophorétique (fig. 1).

La quantité de précipité n'est pas plus grande qu'avec les immunsérums des groupes *a* et *b*. Les rapports moléculaires anticorps-antigène à l'équivalence sont même un peu plus faibles : 1,5 pour le polysaccharide III, 0,45 pour le polysaccharide I.

d) Avec un immunsérum (n° 391) nous avons obtenu en gélose (pl., fig. E) une réaction d'identité entre les deux polysaccharides. Nous n'avons pas pu établir si, en milieu liquide, l'absorption de cet immunsérum par un polysaccharide faisait disparaître tous les anticorps contre l'autre, quel que soit le sens de l'épuisement.

3° Nous avons cherché à modifier ces réactions de précipitation par incubation des antisérums avec des sucres simples.

On peut expliquer aussi de cette manière le fait que les immunosérums donnent une plus ou moins grande quantité de précipité pour une même quantité d'antigène (et un rapport moléculaire anticorps-antigène variable). Il est logique que les immunosérums contenant le plus d'anticorps différents fournissent les chiffres de précipité les plus élevés. Ceci est vrai dans une mesure assez grande. Cependant l'immunosérum T105, le plus complet de tous, ne donne pas plus de précipité pour une même quantité d'antigène que les immunosérums qualitativement un peu moins riches.

Il faut enfin insister sur la variabilité de la composition qualitative des immunosérums. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus par Lapresle avec les immunosérums anti-sérumalbumine humaine : on sait que Lapresle a pu séparer, par protéolyse enzymatique ménagée, trois motifs antigéniques de la sérumalbumine humaine, et montrer qu'à chacun d'entre eux correspond un anticorps différent [18]. Ces trois anticorps étaient toujours présents, encore qu'en quantités diverses, dans les nombreux immunosérums ainsi étudiés, qui n'avaient donc pas de variations qualitatives [18]. Par contre, dans des études sur les γ -globulines humaines et les anticorps correspondants, nous avons observé une grande diversité dans la composition qualitative des immunosérums [4]. Il est fort possible que ces divergences soient, au moins partiellement, sous la dépendance de l'antigène injecté.

C. Rapports avec la structure chimique des polysaccharides. Les similitudes dans la réactivité immunochimique de ces deux polysaccharides nous ont amené à leur supposer une identité structurale partielle. Nous avons ainsi rejoint les travaux faits par de nombreux chercheurs sur les polysaccharides extraits du bacille tuberculeux. En effet, voici vingt ans environ que Heidelberger et Menzel [14], puis Chargaff et Schaefer [6] ont isolé à partir des corps bacillaires deux polysaccharides contenant tous deux de l'arabinose et du mannose. Auparavant, un polysaccharide voisin, sinon identique à l'un de ceux-ci à en juger par sa composition chimique et son pouvoir rotatoire, avait été obtenu par Laidlaw et Dudley [16] à partir des bacilles entiers, par Masucci [20] des filtrats de culture. D'un autre côté, Anderson [4] a pu montrer que la cire D extraite des corps bactériens était un lipopolysaccharide libérant par hydrolyse un polysaccharide contenant du mannose, du galactose et de l'arabinose. Stacey [24] et ses collaborateurs ont purifié à partir des corps bacillaires et étudié deux polysaccharides, tous deux hautement ramifiés et contenant du D-arabinose et du D-mannose : l'un lié aux lipides [11], l'autre « somatique » [10]. Ce dernier avait en outre dans sa molécule du L-rhamnose et un aminohexose, l'autre était formé en plus de D-galactose et de glucosamine. C'est à une

composition voisine que sont arrivés Asselineau et Lederer [2], en étudiant le polysaccharide obtenu par hydrolyse du lipopolysaccharide PMKO isolé par Choucroun [7] : ils y ont trouvé du galactose, du mannose, de l'arabinose. Seibert, dans son polysaccharide I, a signalé aussi la présence de mannose et d'arabinose.

Nous avons vu, dans un article précédent, comment on peut réunir tous ces résultats et admettre l'existence, tant dans les corps bacillaires que dans les filtrats de culture, de deux polysaccharides ayant en commun du mannose et de l'arabinose, et en propre du rhamnose ou du galactose (sans parler de l'existence possible de sucres aminés). Une telle structure s'accorde parfaitement avec nos constatations immunochimiques, et tout particulièrement avec le résultat de nos expériences d'inhibition : nous avons pu en effet diminuer d'environ 30 p. 100, par incubation préalable de l'immunsérum avec un mélange d'arabinose et de mannose, la quantité de précipité spécifique obtenue avec les deux polysaccharides, l'inhibition étant du même ordre pour chacun d'entre eux, ce qui nous paraît essentiel. Nous croyons donc être en droit d'affirmer que le D-mannose et l'arabinose entrent dans la structure commune aux deux polysaccharides. Nous ne pouvons dire de quel isomère de l'arabinose il s'agit, car l'expérience d'inhibition a été faite avec un mélange des deux isomères.

Nous avons comparé ces résultats à ceux d'autres auteurs qui ont essayé d'inhiber la précipitation spécifique de polysaccharides complexes en incubant préalablement les antisérums avec des sucres simples. Kabat [15] a ainsi montré que le glucose, et mieux encore les osides faits de deux ou plusieurs chaînons de glucose, pouvaient inhiber plus ou moins complètement la précipitation spécifique du dextrane par les anticorps correspondants. Staub et Tinelli [25] ont étudié l'influence inhibitrice des divers oses constitutifs des polyosides de *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* B sur la précipitation de ces polysaccharides par leurs immunsérums. Elles ont vu que le rhamnose et le tyvélose avaient seuls un pouvoir inhibiteur. Ces deux sucres étaient en position terminale, à en juger par les résultats de l'oxydation périodique et de l'hydrolyse ménagée.

Par analogie, nous sommes amené à penser que l'arabinose et le mannose ont une position terminale, sinon sur la chaîne principale, au moins sur des chaînes latérales. Cette hypothèse est en accord médiocre avec la structure proposée par Haworth, Kent et Stacey [40, 41].

Enfin, il est possible d'affirmer que le court peptide qui entre normalement dans la constitution du polysaccharide III [3] n'intervient pas dans la réaction de précipitation, au moins en ce qui concerne les immunsérums essayés.

RÉSUMÉ

Les polysaccharides I et III contenus dans les corps et les filtrats de culture de bacilles tuberculeux ont une parenté immuno-chimique qui se révèle de manières diverses selon les immun-sérums. Ceux-ci peuvent ne réagir qu'avec l'un des deux polysaccharides, être absorbés totalement par un polysaccharide et partiellement par l'autre (le sens de cette réaction étant variable), ou encore n'être que partiellement absorbés par chacun des deux polysaccharides. Ces différences de réactions dépendent des variations dans la composition qualitative des immun-sérums.

La parenté immuno-chimique des deux polysaccharides est due à une identité partielle de leur composition, tous deux ayant dans leur molécule du mannose et de l'arabinose. Ce sont ces sucres qui, comme l'ont montré les expériences d'inhibition, sont responsables, au moins pour une part, des réactions croisées.

★ ★

Nous avons les plus vifs remerciements à adresser à ceux qui nous ont donné des échantillons de polysaccharides purifiés. MM. Lederer et Asselineau, M. Bretey, M^{lle} Choucroun, MM. Sorkin et Boyden. Nous sommes particulièrement redevable à M. Grabar de ses conseils.

Nous avons aussi à remercier MM. Serrurier et Malherbaud de leurs soins aux animaux, M. Bocher de ses photographies.

SUMMARY

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON SOLUBLE ANTIGENS OF TUBERCLE BACILLI.

II. — IMMUNOCHEMICAL STUDIES OF TWO POLYSACCHARIDES
PRESENT IN CULTURE FILTRATES OF TUBERCLE BACILLI.

There exists an immunochemical relationship between the polysaccharides I and III present in t. b. bacterial cells and culture filtrates. This relationship can be demonstrated with immune sera, which may either react with one only of the two polysaccharides, or be totally absorbed by one polysaccharide and partially absorbed by the other one, or be only partially absorbed by each of the two polysaccharides. These different reactions depend on the qualitative constitution of the immune sera.

The immunochemical relationship of the two polysaccharides is due to a partial identity of their constitution, the molecule of both containing mannose and arabinose. Inhibition experiments have proved that these sugars were responsible, at least partially, of the cross-reactions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDERSON (R. J.). *J. biol. Chem.*, 1929, **83**, 505 et **85**, 327.
 - [2] ASSELINEAU (J.), CHOUCROUN (N.) et LEDERER (E.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1950, **5**, 197.
 - [3] ASSELINEAU (J.), BUC (H.), JOLLES (P.) et LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 1953.
 - [4] BURTIN (P.). [Non publié.]
 - [5] BURTIN (P.) et KOURILSKY (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**.
 - [6] CHARGAFF (E.) et SCHAEFER (W.). *J. biol. Chem.*, 1935, **112**, 393.
 - [7] CHOUCROUN (N.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 203 et *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 104.
 - [8] GORNALL (A.), BARDAWILL (C.) et DAVID (M.). *J. biol. Chem.*, 1949, **197**, 751.
 - [9] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr). *Bioch. Bioph. Acta*, 1953, **10**, 193 et 1955, **15**, 67.
 - [10] HAWORTH (N.), KENT (P. W.) et STACEY (M.). *J. Chem. Soc.*, 1948, 1211.
 - [11] HAWORTH (N.), KENT (P. W.) et STACEY (M.). *J. Chem. Soc.*, 1948, 1220.
 - [12] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). *J. exp. Med.*, 1935, **61**, 563.
 - [13] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). *J. exp. Med.*, 1937, **65**, 647.
 - [14] HEIDELBERGER (M.) et MENZEL (A.), *J. biol. Chem.*, 1937, **118**, 79 et 1939, **127**, 221.
 - [15] KABAT (E. A.). *J. Immunol.*, 1956, **77**, 377.
 - [16] LAIDLAW (P. P.) et DUDLEY (H.). *Brit. J. exp. Path.*, 1925, **6**, 197.
 - [17] a) LAMENSANS (A.), GRABAR (P.) et BRETEY (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1967 ; b) [Non publié].
 - [18] LAPRESLE (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
 - [19] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 833.
 - [20] MASUCCI (P.), MAC ALPINE (K.) et GLENN (J. T.). *Am. Rev. Tub.*, 1930, **22** 669.
 - [21] OUCHTERLONY (O.). *Arkiv. Kemi*, 1948, **26 B**, n° 14.
 - [22] SEIBERT (F. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 86.
 - [23] SORKIN (E.) et BOYDEN (S.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 22.
 - [24] STACEY (M.). *Progrès dans l'Exploration de la tuberculose*. Karger, édit., 1955, **6**, 7.
 - [25] STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, Suppl. **4**, 65.
 - [26] TENNENT (D.) et WATSON (D.). *J. Immunol.*, 1942, **45**, 179.
 - [27] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
-

UN CARACTÈRE DIFFÉRENTIEL DES SOUS-SOUCHES DU BCG

par K. C. GUPTA, M. PANISSET, J.-C. BENOIT et A. FRAPPIER (*).

*(Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal,
Ecole d'Hygiène de l'Université de Montréal
et Faculté de Médecine de l'Université de Montréal,
Département de Bactériologie)*

Nous avons entrepris une étude générale pour connaître la signification génétique, génotypique ou phénotypique, des variations provoquées chez cinq sous-souches du BCG par les conditions d'entretien, différentes par quelque détail d'un laboratoire à l'autre. Pour apprécier ces variations nous utilisons, entre autres critères, l'évaluation des proportions relatives des colonies de type « spreading », « non spreading » et « intermediate », décrites par Dubos et Suter [9] et par Dubos, Pierce et Schaeffer, après ensemencement sur milieu albumine-acide oléique des diverses sous-souches étudiées. Cette évaluation est faite, sur les suspensions de BCG préparées et lyophilisées dans des conditions rigoureusement identiques, peu après la réception de la culture de son laboratoire d'origine. Elle est répétée lorsque chaque culture a subi un cycle d'entretien selon la méthode employée depuis près de trente ans à l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal (cinq passages de quatorze jours sur pomme de terre glycinée, un passage de quatorze jours sur pomme de terre glycinée billée).

Nous inspirant d'une méthode proposée par Huddleson [5] pour la différenciation des espèces bactériennes et la mise en évidence de leurs variations, nous avons cherché à établir la morphologie des divers types de colonies de BCG en mettant à profit leur pouvoir de fixer le triphényltétrazolum, dissous dans le milieu de culture, et de le réduire en formazan dont la couleur est pourpre. Cette technique, que nous avons cherché à appliquer au dépistage précoce des colonies de bacilles tuberculeux au cours d'essais non publiés entrepris en 1954 avec la collaboration du Dr O. Morgante, s'est révélée inapplicable à l'étude du BCG. En effet, ainsi d'ailleurs que nous l'avons constaté lors de ces essais de diagnostic bactériologique précoce, le triphényltétrazolum

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 17 avril 1959.

inhibe de façon sensible le développement des colonies de BCG aux concentrations utilisées (0,001 à 0,005 p. 100). Il ne pouvait donc être employé dans des expériences quantitatives, étant donné que l'inhibition peut s'exercer de façon plus marquée sur un type de colonie que sur un autre. M^{lle} Mireille Gastambide-Odier et D. W. Smith ont proposé récemment une épreuve de différenciation des Mycobactéries basée sur une action inhibitrice sélective du néo-tétrazolum [3, 4]. Il est à signaler, d'autre part, que Huddleson et Baltzer [6] ont mis au point cette technique et l'ont employée avec succès pour l'étude de bactéries ne prenant pas la coloration de Gram.

Nous avons alors décidé de faire agir le chlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolum sur les colonies de BCG suffisamment développées et différenciées vingt et un jours après l'ensemencement.

TECHNIQUE.

1 cm³ de solution aqueuse de chlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolum est déposé sur le milieu de culture dans le fond de la boîte de Petri. Celle-ci est inclinée avec précaution, en même temps qu'elle subit un mouvement de rotation : le contact est ainsi réalisé entre toutes les colonies et le réactif. La boîte munie de son couvercle est portée à l'étuve à 37° C durant douze heures.

RÉSULTATS.

Appliquée aux colonies issues de la sous-souche Moreau, par exemple, cette technique colore en rouge sombre toutes les colonies, quel que soit leur type. L'intensité de la coloration est à peu près homogène en tous les points de la surface de la colonie. Le milieu de culture ne se colore pas.

L'examen, dans les mêmes conditions, des cultures des autres sous-souches du BCG qui font l'objet de notre étude nous a révélé des différences frappantes. Toutes les colonies issues de certaines sous-souches réduisent fortement le triphényltétrazolum, qu'elles soient « spreading », « non-spreading » ou « intermediate » ; par contre, toutes les colonies issues d'autres sous-souches ne réduisent le triphényltétrazolum que de façon très faible.

Le tableau I met en évidence ces différences de coloration. Il indique, pour chaque sous-souche, le pourcentage de colonies « spreading », « non spreading » et « intermediate » qui la caractérise. Ce pourcentage résulte de l'examen quantitatif de 6 boîtes de Petri ensemencées avec un inoculum de même provenance et de même volume. Ces mêmes boîtes ont servi à faire les examens au triphényltétrazolum.

TABLEAU I.

SOUS-SOUCHES	TYPES DE COLONIES			ASPECT DES COLONIES TRAITÉES AU TRIPHÉNYLTÉTRAZOLIUM
	Spr.	N. Spr.	Interm.	
I. M.	98 *		2	Centre de la colonie rose. Pourtour non coloré par le formazan (12-24 h). (fig. 1).
Co	86,3	13,7		Mêmes caractères.
R.		43,6	56,4	Colonies pourpre intense en 1 h. Coloration homogène (fig. 2).
M.		95,9	4,1	Id. (fig. 3).
S.	69	22	9	Centre de la colonie rose. Pourtour non coloré par le formazan (12-24 h).

* Examen de 100 colonies par boîte de Petri.

Nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'intensité du pouvoir réducteur des colonies d'une sous-souche donnée et l'intensité du pouvoir réducteur d'une suspension d'éléments bactériens de la même sous-souche, mesuré par la technique qui a été décrite par Benoît, Vallée et Panisset [4].

Le tableau II, établi d'après les moyennes de six déterminations, montre des résultats peu différents pour chacune des cinq sous-souches.

TABLEAU II.

POURCENTAGE DE TRANSMISSION A 450

I. M.	57,6
Co	64,75
R	46,15
M	65,75
S	59,66

La réduction du triphényltétrazolum par les colonies et par une suspension bactérienne est sous la dépendance de facteurs différents, que nous nous proposons de rechercher.

Il est, d'autre part, intéressant de noter que les sous-souches I. M. (Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal), Co (Staten Serum Institut), S (Bacteriological

FIG. 1. — Colonies âgées de trois semaines, sur milieu solide Dubos, après traitement par le chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolum. Sous-souche Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal du BCG.

FIG. 2. — Colonies âgées de trois semaines, sur milieu solide Dubos, après traitement par le chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolum. Sous-souche 946 BL du BCG (B). Cette culture nous a été aimablement confiée par le Dr S. Rosenthal (Tice Laboratory, Chicago, Ill.) qui ne l'utilise plus depuis quelques années pour la préparation du vaccin BCG.

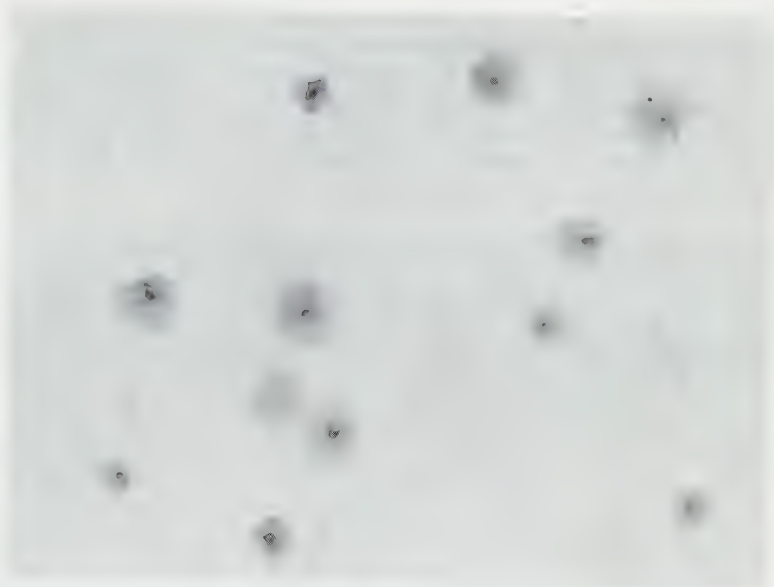


Fig. 1

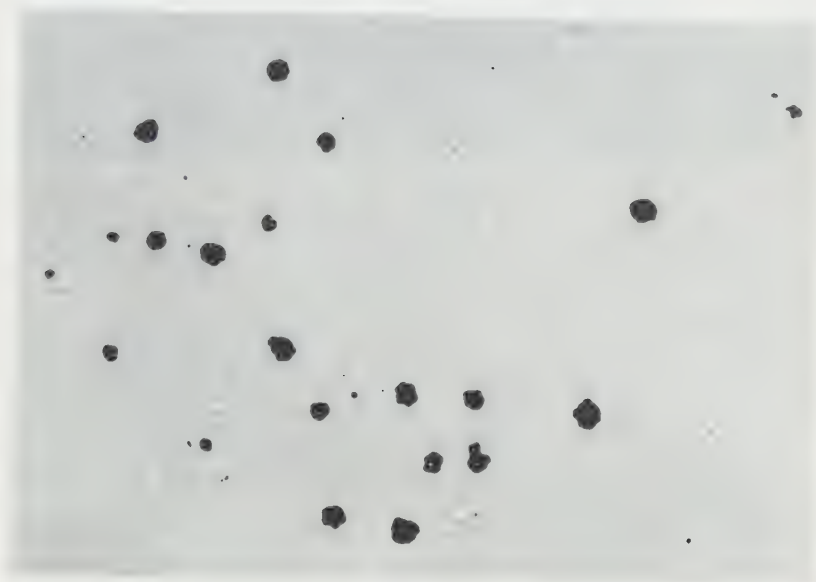


Fig. 2

Laboratory, Goteborg, Suède), sont toutes trois utilisées pour la préparation de vaccin administré par les méthodes classiques.

Par contre, la sous-souche R (946 BL) est conservée au Tice Laboratory, mais le Dr S. Rosenthal, qui a bien voulu la mettre à notre disposition, a spécifié qu'elle n'était plus employée pour la préparation du vaccin depuis plusieurs années. Dubos et Suter [9] avaient signalé dans l'étude citée plus haut la pauvreté



FIG. 3. — Colonies âgées de trois semaines, sur milieu solide Dubos, après traitement par le chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolium. Sous-souche Moreau du BCG (M).

de cette sous-souche en « cord factor » et la faiblesse de son pouvoir immunisant pour la souris. La sous-souche Moreau (M) a fait l'objet de nombreuses études. Elle peut être administrée à l'enfant par la voie buccale à des doses énormes (100 mg) sans provoquer de réactions. Dubos et ses collaborateurs [8, 9], Kurylovicz [7] ont signalé qu'elle était pauvre en « cord factor » et immunisait faiblement la souris.

Faut-il considérer que c'est le « cord factor » qui empêche l'action du triphényltétrazolium sur les colonies de certaines sous-souches ? Des travaux en cours permettront peut-être de le démontrer. L'intensité de cette réduction ne semble pas être modifiée

par les conditions uniformes d'entretien auxquelles nous soumettons ces sous-souches depuis plusieurs mois.

En raison de la simplicité de cette technique et de la netteté de ses résultats, il nous a paru opportun de la soumettre à ceux qui s'intéressent à la bactériologie du BCG et aux variations de la souche du BCG.

RÉSUMÉ.

Le pouvoir de réduction des colonies de BCG pour le chlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolium montre de larges variations suivant les sous-souches de BCG. Ce pouvoir semble caractéristique de la sous-souche et indépendant des caractères morphologiques des colonies qui en proviennent.

SUMMARY

A DIFFERENTIATION CHARACTER OF THE BCG SUBSTRAINS.

The reducing power of BCG colonies for 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride showed wide variations according to the substrains of BCG tested.

This power appears to be a character of the substrains and is independant of the morphology of the colonies deriving from them.

Note. — Ce travail était déjà sous presse lorsque nous avons eu connaissance de celui de A. Hirsch et C. Cattaneo (*Nuovi Ann. Igiene Microb.*, 1959, **10**, 46-61). Ces auteurs, avec une technique différente, montrent que la réduction du triphényltétrazolium peut servir à la différenciation des espèces de mycobactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BENOIT (J.-C.), VALLÉE (J.) et PANISSET (M.). [Communication présentée au XXIII^e Congrès de l'A. C. F. A. S., 6 novembre 1955.]
- [2] FRAPPIER (A.) et PANISSET (M.). *La souche du BCG*. Monographie de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal, 1957, 120 p.
- [3] GASTAMBIDE-ODIER (M.) et SMITH (D. W.). *Am. Rev. Tub.*, 1958, **77**, 669.
- [4] GASTAMBIDE-ODIER (M.) et SMITH (D. W.). *Am. Rev. Tub.*, 1958, **77**, 662.
- [5] HUDDLESON (I. F.). *Michigan State College agric. exp. Station, Dept. Bact.*, 1951, part **4**, 77 (11 réf.).
- [6] HUDDLESON (I. F.) et BALTZER (B.). *Rep. School veter. Med. Michigan State College*, 1950, 50.
- [7] KURYLOVICZ (W.). *Acta tub. scand.*, 1957, **33**, 354.
- [8] PIERCE (C. H.) et DUBOS (R. J.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **77**, 662.
- [9] SUTER (W. E.) et DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 559.

ENZOOTIE D'ADÉNITES SUPPURÉES CHEZ LE RAT BLANC PROVOQUÉE PAR UN ACTINOBACILLE

par A. VALLÉE, M. PIÉCHAUD, P. DESTOMBES et L. SECOND (*).

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale, Service de Microbie Technique et Service d'Histopathologie.*)

En décembre 1958, notre attention fut attirée par la mauvaise qualité des rats blancs d'un élevage du département de la Mayenne. De nombreux animaux présentaient une tuméfaction de la région cervicale inférieure ; chez d'autres une cicatrice révélait une lésion ancienne. Il s'agissait, l'examen histologique le confirma, d'adénites suppurées des ganglions cervicaux. Les lésions évoluaient lentement, atteignant la dimension d'une noisette, adhérant fortement à la peau. Celle-ci se fistulisait et donnait issue au contenu purulent, grisâtre ou blanc verdâtre, de l'abcès. Exceptionnellement, on pouvait observer de la pneumonie, mais dans la grande majorité des cas la maladie évoluait sans complications. Les ensemencements permirent l'isolement d'un micro-organisme dont nous allons exposer les caractères.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

Les frottis de pus colorés révèlent la présence de formes en coques, très petites, de cocco-bacilles ou de bacilles. Les éléments les plus courts ont la taille et le diamètre de *Pasteurella septica*, les plus allongés dépassent rarement 4 ou 5 μ . Ils sont isolés ou en amas, dont certains ont un contour nettement circulaire. Le microbe ne reste pas coloré par la méthode de Gram.

Dans les cultures jeunes en milieux liquides, les formes bacillaires sont plus nombreuses ; elles sont droites ou légèrement recourbées. Après coloration par la méthode de Gram, certaines ont un espace clair central. On note la présence de rares éléments nettement filamenteux, dont la taille peut atteindre 15 μ .

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 juin 1959.

Les micro-organismes sont isolés, en courtes chaînes, ou en amas plus ou moins arrondis.

Les frottis colorés des cultures sur milieux solides permettent de constater le même pléomorphisme.

Le microbe est immobile et ne forme pas de spores. Nous n'avons pu mettre de capsule en évidence.

CARACTÈRES DES CULTURES.

Milieux d'isolement.

Bouillon nutritif : Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 37° l'agitation révèle des ondes et l'on constate la présence de nombreux grains fins qui ont une tendance à se coller sur les parois et à se déposer au fond du tube. Ils forment à la partie supérieure un anneau blanchâtre et parfois un voile fragile.

Bouillon-sérum : Culture en grains. Le milieu est clair ou très peu troublé.

Les repiquages successifs modifient l'aspect des cultures en milieux liquides ; on observe alors des ondes et les « grains » disparaissent.

Gélose nutritive : A l'isolement les colonies sont plutôt sèches, mais après repiquage elles deviennent lisses, blanchâtres, à bords arrondis, bleuâtres par transparence. Leur diamètre dépasse rarement 3 mm. Soumises à un éclairage incident de 45° et examinées à la loupe binoculaire elles montrent une légère iridescence.

Gélose-sérum : Culture du même type que précédemment, mais les colonies sont plus abondantes.

Gélose profonde : Le microbe se développe dans toute la hauteur du milieu ; les colonies ont la forme de lentilles biconvexes ; elles sont lisses, blanchâtres.

Milieux d'identification.

Eau peptonée : Culture en « grains » avec anneau blanchâtre à la partie supérieure du tube. Il n'y a pas formation d'indole.

Eau de levure : Pas de culture.

Lait tournesolé : Pas de modification du milieu.

Gélose au sang de mouton : Les colonies sont blanchâtres, bombées, lisses, à bords réguliers. Il n'y a pas d'hématolyse.

Gélatine : A 20°, pas de liquéfaction. A 37°, culture de type granulaire.

Sérum coagulé : non digéré.

Pomme de terre naturelle : Culture discrète à l'origine du trait d'ensemencement.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

Le glucose, le lévulose, le mannose, le xylose sont fermentés sans production de gaz. Il en est de même du maltose, du saccharose, de la mannite, de la dulcité, de la salicine et de la dextrine ; avec la dulcité et la salicine nous avons observé une alcalinisation secondaire. L'amidon est hydrolysé. Le rhamnose, le raffinose, le lactose ne sont pas touchés ; le galactose est fermenté lentement.

Le micro-organisme est sans action sur l'esculine. Il réduit les nitrates en nitrites, n'élabore pas de catalase. Dans le milieu urée-indole, l'urée est hydrolysée en une dizaine d'heures. La réaction au rouge de méthyle et la réaction de Vosges-Proskauer sont négatives. En gélose au sous-acétate de plomb on ne décèle que des traces d'hydrogène sulfuré.

Vitalité : Dans le pus conservé en couche mince à + 4° le microbe ne survit qu'une semaine. En bouillon nutritif conservé à la température du laboratoire il survit plus de sept semaines.

Résistance : Les cultures en bouillon sont stérilisées après cinq minutes de chauffage à 60°.

POUVOIR PATHOGÈNE A L'ÉGARD DU RAT BLANC.

Essais réalisés avec le matériel purulent.

La lésion d'adénite suppurée a été reproduite chez le rat blanc au cours de 5 passages successifs grâce à l'administration *per os* de pus non dilué. Avec la pipette servant à l'inoculation, nous pratiquions quelques scarifications à l'intérieur de la cavité buccale.

Au cours du premier passage les abcès sont apparus chez 3 des rats soumis à l'épreuve (sur un total de 4) respectivement après onze jours, onze jours et quinze jours.

Au deuxième passage, nous avons obtenu 5 résultats positifs pour un total de 6 rats inoculés et au troisième passage 2 sur 4.

Nous avons noté un allongement marqué de la période d'incuba-

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Actinobacillose du rat. Adénite suppurée. Présence de « grains » dans la zone purulente ; périadénite subaiguë. Hématéine-éosine safran. Y 1775, Institut Pasteur, Oc. 10, Obj. 12, Gr. : 135.

FIG. 2. — Un grain actinobacillaire. Oc. 10, Obj. 50, Gr. : 610. Même cas.

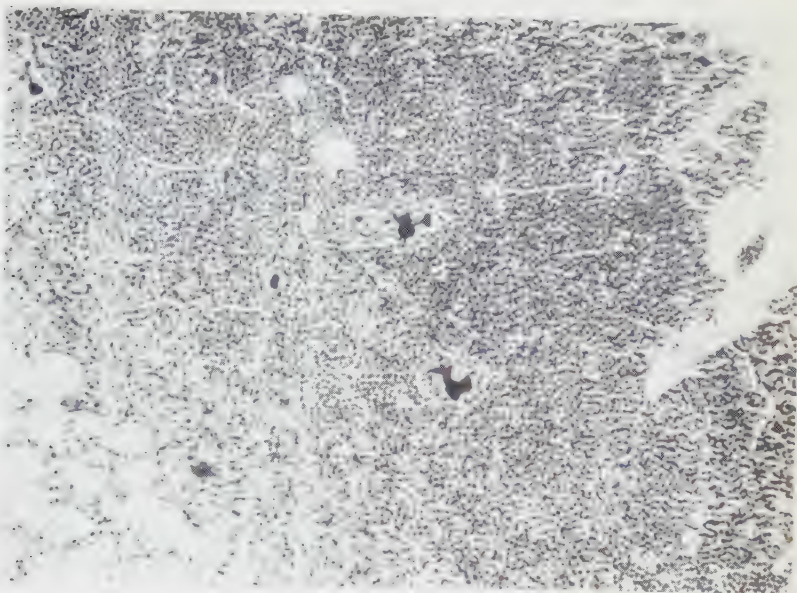


FIG. 1.

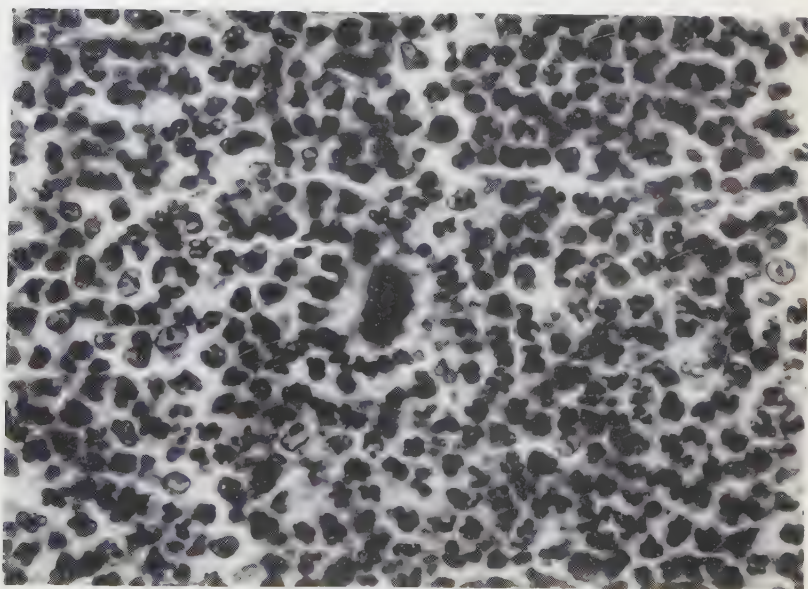


FIG. 2.

tion par rapport à notre premier essai. En effet, certains abcès ne sont apparus qu'après trois et même quatre semaines.

Des complications pulmonaires : broncho-pneumonie et pneumonie sont apparues parfois au cours des divers passages.

L'adénite suppurée a été reproduite également chez un rat inoculé avec une dilution de pus par la voie sous-cutanée. Elle est apparue tardivement, après quatre semaines.

Essais réalisés avec les cultures.

Deux rats reçoivent par voie péritonéale 1 ml d'une suspension de culture sur gélose inclinée (5 ml d'eau physiologique pour un tube de 17). Ils succombent après quatre jours. L'autopsie révèle des lésions de péritonite exsudative.

Deux rats reçoivent par voie péritonéale 1 ml de culture de vingt-quatre heures en bouillon. Onze jours après on constate chez l'un une arthrite tibio-métatarsienne et un abcès au point d'inoculation. L'autopsie, pratiquée six semaines plus tard, ne révèle rien d'autre.

Le second est sacrifié dans le même délai, dans un état de cachexie extrême. L'autopsie révèle de nombreux foyers purulents sur le foie, la rate, le mésentère et en plusieurs points de la tunique abdominale. La fosse iliaque droite est occupée par un abcès de la taille d'un œuf de pigeon.

Les inoculations sous-cutanées de cultures en bouillon ou de suspensions de cultures sur gélose inclinée provoquent la formation d'abcès au point d'inoculation et parfois l'adénite suppurée de la région cervicale. (Cette dernière lésion a été reproduite chez deux rats après une incubation de quatre et cinq semaines.)

L'inoculation de culture par voie nasale permet parfois d'observer des lésions massives de pneumonie purulente.

POUVOIR PATHOGÈNE POUR LES AUTRES ANIMAUX DE LABORATOIRE.

Le cobaye et le lapin supportent apparemment sans troubles graves les inoculations de cultures et de suspensions de pus. Les injections sous-cutanées provoquent la formation d'abcès qui guérissent spontanément ; parfois on note un simple érythème.

Chez la souris inoculée par la même voie avec les cultures on observe des abcès et des escarres très étendues, parfois des foyers de nécrose dans les muscles environnants. Inoculées par la voie péritonéale, les souris succombent en un temps variable, vingt-quatre heures à plusieurs jours. Dans ce dernier cas, l'autopsie

révèle des foyers purulents en différents points de la cavité abdominale. Le germe peut être isolé du sang du cœur, des poumons, du foie et de la rate, alors que chez le rat inoculé par la même voie son pouvoir de diffusion est en général faible. En effet, il est exceptionnel de le retrouver en dehors des viscères abdominaux.

HISTO-PATHOLOGIE.

I. — Les lésions cervicales *spontanées* du rat n° 10 (examen Y. 1775) intéressent essentiellement les ganglions voisins des glandes salivaires. Il existe une périadénite scléro-inflammatoire très intense respectant cependant les glandes. Parmi ces ganglions, certains ne sont qu'en réaction inflammatoire subaiguë banale ; d'autres, au contraire, très hypertrophiés, sont le siège d'une nécrose purulente éosinophile centrale entourée d'épaisses couronnes de polynucléaires neutrophiles peu altérés, avec participation d'assez nombreux polynucléaires éosinophiles.

Dans ces couronnes se trouvent de nombreux « grains » d'actinobacilles : ils sont de petite taille et ne dépassent pas 100 μ , à contours très irréguliers, fortement hématephiles ; ils sont hérissés d'une mince bordure massuée éosinophile à l'hémalum-éosine, mais non fuchsinophile au Ziehl Gram, comme dans les vrais grains « actinomycosiques ». Les bactéries ne sont pas discernables dans la masse homogène du « grain ».

II. — Dans les lésions *expérimentales* réalisées chez le rat :

A. — *Par inoculation du pus ganglionnaire* on observe :

a) Après onze jours (Y. 1937) des lésions cervicales constituées par une volumineuse adénite suppurée dans un groupe ganglionnaire en inflammation subaiguë. La suppuration héberge des amas bactériens un peu plus volumineux que ceux de la lésion spontanée, car atteignant 150 μ , mais dépourvus de bordure éosinophile.

L'infection s'est propagée aux poumons où s'observe une broncho-pneumonie diffuse avec importante suppuration bronchique dépourvue d'amas microbiens.

b) Après quatre semaines (rat 11 Z. 98) l'adénite suppurée observée à l'état spontané a pu être reproduite dans tous ses caractères, en particulier dans la morphologie des grains dont la bordure est massuée, mais non fuchsinophile.

B. — *Par inoculation intrapéritonéale de cultures*, le rat présente au quatrième jour une péritonite aiguë et un abcès rénal dépourvu encore d'amas bactériens (Z. 15). Ceux-ci, par contre, apparaissent nombreux au douzième jour au sein d'énormes abcès purulents hépatiques (Z. 195), mais ils ne reproduisent pas la

morphologie complète des grains spontanés : ils sont dépourvus de bordure. Les abcès sont isolés du parenchyme par une importante sclérose.

C. — *Par inoculation sous-cutanée*, le rat (Z. 97) présente après trois jours un abcès au point d'inoculation et après quatre semaines une importante adénite suppurée de la région cervicale. Une périadénite scléro-inflammatoire s'étend à distance jusqu'à disséquer la périphérie des glandes salivaires voisines. Des amas bactériens toujours hémateiphiles et dépourvus de bordure éosino-phile s'observent dans les zones purulentes jeunes.

D. — Enfin, *après inoculation intranasale* (rat 8, Z. 17) on note chez cet animal mort au douzième jour une broncho-pneumonie très diffuse et très sclérosante, de nombreux abcès purulents, du pus dans les bronches avec toujours les mêmes amas bactériens. Ceux-ci, vus à l'immersion, sont formés de fines granulations très serrées.

Les amas bactériens sont déjà nombreux dans le pus des ganglions abdominaux et trachéo-bronchiques d'une *souris* morte spontanément trois jours après inoculation intrapéritonéale (Z. 16).

Au total, le pus de l'adénite originelle infectée par cet actinobacille, inoculé au rat par scarifications de la muqueuse buccale, entraîne l'apparition d'adénites cervicales suppurées, avec formation de nouveaux grains qui, quatre semaines après l'inoculation, apparaissent identiques aux grains de la maladie spontanée.

Avec des cultures inoculées par la voie sous-cutanée on provoque des suppurations identiques, mais les amas bactériens que l'on retrouve ne revêtent pas la morphologie complète des grains de la maladie spontanée ; la bordure micromassuée leur fait défaut.

POSITION DU GERME DANS LA SYSTÉMATIQUE.

Les caractères morphologiques et cultureux du micro-organisme, ses propriétés biochimiques, l'aspect des lésions dans la maladie spontanée ou expérimentale nous autorisent à le classer dans le genre *Actinobacillus*. Il a un certain nombre de caractères communs avec *Pasteurella septica*, mais il élabore une uréase. Il diffère de *Cillo-pasteurella pseudo-tuberculosis* par son absence d'action sur le rhamnose ; il est immobile et sa culture n'est pas inhibée par le bactériophage du bacille de Malassez et Vignal. *Actinobacillus actinomyces comitans* n'élabore pas d'uréase.

La souche diffère sur deux points d'*Actinobacillus lignieresii* tel qu'il est décrit dans *Bergey's Manual* : il n'est pas indologène et il réduit les nitrates en nitrites, mais les trois souches d'*Actinobacillus lignieresii* de la collection de l'Institut Pasteur ont un comportement identique. L'étude sérologique en cours permettra peut-être l'identification précise du germe.

RÉSUMÉ.

Au cours d'une enzootie sévissant dans un élevage de rats blancs et caractérisée par des adénites suppurées des ganglions cervicaux, nous avons isolé un *Actinobacillus* voisin d'*Actinobacillus lignieresii*. La lésion essentielle et les grains qu'elle contient ont été reproduits chez le rat blanc au cours de 5 passages successifs, grâce à l'administration *per os* de pus non dilué.

SUMMARY

SUPPURATED ADENITIS ENZOOTY IN ALBINO RATS,
INDUCED BY AN *Actinobacillus*.

An enzooty characterized by suppurated adenitis of cervical nodes appeared in a stock of albino rats. From the pus of these nodes, the authors have isolated an *Actinobacillus* related to *Actinobacillus lignieresii*. The lesion and the grains which it contains have been experimentally induced in albino rats by means of *per os* administration of non diluted pus.

IMMUNISATION DU LAPIN EN DEUX INJECTIONS PAR L'ANATOXINE STAPHYLOCOCCIQUE ALPHA

INFLUENCE DE L'INTERVALLE, DE LA DOSE
ET DE LA VOIE D'INTRODUCTION DE L'ANTIGÈNE

par J. PILLET, B. ORTA et M. PERRIER (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Nous avons, au cours de ce travail, étudié les modifications du taux d'antitoxine staphylococcique α observées chez des lapins recevant 2 doses d'anatoxine α . Les animaux étudiés ont été répartis en 3 groupes dans lesquels on a fait varier la voie d'introduction de l'antigène, l'intervalle des injections et enfin les doses injectées lors de la première ou de la deuxième injection. Les résultats de ce travail devraient nous permettre de mesurer ultérieurement avec plus de précision la part qui revient à l'immunité antitoxique dans les mécanismes de défense entrant en jeu chez le lapin au cours de l'infection staphylococcique expérimentale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

MATÉRIEL. — *Animaux.* — Lapins blancs mâles d'un poids moyen de 2 kg. Seuls ont été utilisés des lapins dont le taux d'antitoxine sérique était égal ou inférieur à 0,04 U./cm³. Nous indiquerons plus loin les raisons de ce choix.

Vaccin. — Anatoxine α purifiée de l'Institut Pasteur (D. C. H. = 0,15 cm³, soit conventionnellement 10 U./cm³).

MÉTHODES. — *Immunisation.* Les modalités des différentes vaccinations seront décrites avec chacune des séries d'expériences.

Saignées. Tous les lapins ont été saignés : 1° quelques jours avant la première injection ; 2° la veille ou le jour de la deuxième injection ; 3° quatre jours après la deuxième injection ; 4° dix ou onze jours après la deuxième injection.

Titrages. Méthode hémolytique (globules rouges de lapin). Titre exprimé en unités ou fraction d'unité antitoxiques internationales (U. A. I.).

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 juin 1959.

RÉSULTATS.

Avant de donner le détail des résultats obtenus, nous ferons quelques remarques concernant les difficultés rencontrées au cours de cette expérimentation.

Ces difficultés ont été dues pour une part à l'existence d'animaux présentant avant toute vaccination un certain degré d'immunité naturelle et surtout à la diversité des réactions individuelles constatée chez des animaux vaccinés selon un protocole identique.

Ces variations individuelles peuvent, en effet, être observées :

1° Avant la vaccination. — Il s'agit d'animaux présentant avant toute vaccination une quantité appréciable d'antitoxine dans leur sérum. Ces animaux, qui représentaient le 1/10^e des animaux à notre disposition, n'ont pu être utilisés dans ce travail car si, proportionnellement, l'élévation du taux antitoxique chez ces animaux n'est pas supérieure à celle de lapins ne présentant pas d'immunité avant vaccination, les taux atteints sont très élevés (5 à 10 fois supérieurs à ceux observés chez le lapin sans immunité) et la présence d'un seul lapin de ce type dans une série interdit absolument d'obtenir une moyenne significative. C'est pourquoi nous n'avons utilisé, au cours de cette expérimentation, que des lapins présentant un taux antitoxique égal ou inférieur à 0,04 unité. Ce taux limite qui est inférieur à celui généralement adopté dans les expériences de ce type (0,1 U./cm³) nous a paru suffisamment faible pour éviter qu'interfèrent au cours de notre expérimentation les effets de l'immunité naturelle et ceux de l'immunité acquise.

2° Après la première injection. — La plupart des lapins présentent, lorsque la dose et les délais choisis sont convenables, une faible augmentation du taux de l'antitoxine sérique (0,1 à 0,5 U./cm³). Nous avons constaté, toutefois, qu'un petit nombre d'animaux présentait dans ces conditions un taux égal ou supérieur à 1 unité. Ces animaux atteignent généralement après la deuxième injection un taux particulièrement élevé, sans rapport avec les résultats moyens observés au cours de la série. Pour cette raison, nous n'avons pas utilisé les résultats obtenus avec ces quelques animaux, car notre but était essentiellement, au cours de ce travail, de préciser les réactions moyennes observées chez le lapin en fonction des modalités de la vaccination.

3° Après la deuxième injection. — Les variations individuelles encore considérables permettent cependant, en multipliant le nombre d'animaux, d'obtenir des chiffres significatifs. Nous avons pour cette raison expérimenté sur deux à trois séries d'animaux pour chacun des points étudiés, et les résultats rapportés dans les tableaux sont la moyenne de l'ensemble de ces séries.

1° INFLUENCE DE LA VOIE D'INTRODUCTION DE L'ANTIGÈNE. — Trois groupes de lapins répartis en plusieurs séries ont reçu 2 injections de 10 unités d'anatoxine à dix jours d'intervalle. Les injections ont été pratiquées par les voies suivantes : intradermique,

sous-cutanée et intraveineuse. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I dans lequel, comme dans les suivants, les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'animaux sur lequel la moyenne a été établie. Les dates des saignées ont été précisées au paragraphe « méthodes ».

TABLEAU I.

Voie utilisée	Titre antitoxique			
	1ère saignée	2ème saignée	3ème saignée	4ème saignée
I.D.	0,04 (23)	0,22 (17)	1,54 (15)	2,25 (14)
S.C.	0,04 (23)	0,27 (19)	2,15 (17)	2,21 (14)
I.V.	0,04 (24)	0,21 (19)	1,72 (16)	2,56 (15)

L'étude des résultats rapportés dans le tableau montre qu'il n'existe pas de différence significative dans les taux antitoxiques obtenus après deux injections, quelle que soit la voie utilisée. En effet, si la voie sous-cutanée semble permettre d'obtenir une immunisation plus rapide (*Cf.* résultat au quatrième jour) les chiffres obtenus après dix jours sont très voisins quelle que soit la méthode d'injection choisie.

Il est important de noter que l'égalisation des taux au dixième jour, dans des séries où ceux-ci différaient notablement au quatrième jour, est un phénomène que nous avons rencontré assez souvent au cours de notre expérimentation. Tout se passe comme si le taux maximum d'antitoxine pouvait être atteint au cours d'une série, soit rapidement (quatrième jour), soit tardivement (dixième jour), aucun rapport n'ayant d'ailleurs pu être établi entre la rapidité d'obtention du taux maximum d'antitoxine et un quelconque des facteurs étudiés au cours de ce travail. Quoi qu'il en soit, il est donc indispensable, pour interpréter correctement les résultats obtenus, de tenir compte à la fois des titres observés au quatrième jour et au dixième jour après la deuxième injection.

2° INFLUENCE DE L'INTERVALLE ENTRE LES INJECTIONS D'ANTIGÈNE. --

Les trois techniques de vaccination paraissant sensiblement équivalentes, ainsi que nous venons de le voir, nous avons utilisé la voie intradermique pour étudier l'influence de la durée de l'intervalle entre les deux injections d'antigène sur l'élévation du taux antitoxique. Les intervalles choisis ont été les suivants : deux, quatre, sept, dix, quatorze, vingt et trente jours. Les quantités d'anatoxine injectée étaient de 10 unités à chacune des deux injections.

Les résultats obtenus résumés dans le tableau II montrent que la formation d'antitoxine augmente avec la durée de l'intervalle qui sépare les deux injections d'antigène. L'accroissement du taux d'antitoxine cesse, toutefois, lorsque l'intervalle atteint dix jours, ainsi que le montrent les résultats obtenus après des intervalles de quatorze, vingt et trente jours. Ces derniers résultats sont, en effet, très voisins de ceux constatés lorsque la durée de l'intervalle est seulement de dix jours.

TABLEAU II.

Intervalle (en jours)	Titre antitoxique			
	1ère saignée	2ème saignée	3ème saignée	4ème saignée
2	0,04 (15)	0,04 (15)	0,11 (15)	0,57 (12)
4	0,04 (22)	0,05 (22)	0,20 (20)	0,81 (20)
7	0,04 (15)	0,07 (15)	0,75 (15)	1,29 (13)
10	0,04 (41)	0,22 (37)	2,40 (35)	2,02 (36)
14	0,04 (23)	0,21 (20)	2,20 (18)	2,45 (17)
20	0,04 (28)	0,29 (21)	2,41 (19)	2,98 (20)
30	0,04 (14)	0,11 (8)	1,23 (8)	2,29 (7)

3° INFLUENCE DE LA QUANTITÉ D'ANTIGÈNE INJECTÉE. — Nous avons fait varier, dans une première série d'expérience, la quantité administrée lors de la première injection, la deuxième injection étant uniformément de 10 unités. Inversement, dans un second groupe d'expériences, la première dose injectée a été maintenue constante, la seconde étant variable. Les quantités injectées étant souvent assez importantes, nous avons utilisé dans ce type d'expériences la voie sous-cutanée, les injections étant faites à dix jours d'intervalle.

a) *Première dose variable.* — Les doses administrées lors de la première injection ont été de 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 250 unités, la deuxième injection étant toujours de 10 unités.

Les résultats résumés dans le tableau III montrent que lorsque l'on fait varier la première dose injectée en maintenant la seconde constante, la quantité d'antitoxine présente dans le sérum est fonction de la quantité injectée lors de la première injection. On notera, toutefois, qu'à partir de 10 unités l'augmentation des quantités d'antitoxine administrée ne permet pas d'obtenir un

accroissement du taux antitoxique. On peut en conséquence penser qu'il s'établit un palier dans la réponse immunologique, lorsque la quantité injectée lors de la première injection atteint 10 unités; mais seule l'étude détaillée des points intermédiaires de la zone 10 unités-250 unités permettrait de confirmer cette hypothèse.

TABLEAU III.

Dose 1ère injection (en unités)	Titre antitoxique			
	1ère saignée	2ème saignée	3ème saignée	4ème saignée
0,01	0,04 (13)	0,08 (11)	0,14 (10)	0,66 (10)
0,1	0,04 (13)	0,04 (12)	0,08 (10)	0,61 (10)
1	0,04 (13)	0,08 (13)	0,22 (11)	1,53 (10)
10	0,04 (12)	0,12 (6)	0,81 (10)	2,43 (9)
50	0,04 (18)	0,13 (17)	1,71 (16)	2,38 (16)
250	0,04 (19)	0,29 (14)	2,83 (14)	2,58 (13)

b) *Deuxième dose variable.* — Les doses administrées lors de la deuxième injection ont été de 0,1; 1; 10; 50 et 250 unités, la première dose étant cette fois maintenue constante [10 unités] (tableau IV).

TABLEAU IV.

Dose 2ème injection (en unités)	Titre antitoxique			
	1ère saignée	2ème saignée	3ème saignée	4ème saignée
0,1	0,04 (15)	0,07 (14)	0,41 (14)	0,46 (13)
1	0,04 (16)	0,12 (16)	1,28 (16)	1,28 (16)
10	0,04 (24)	0,20 (23)	2,45 (23)	2,30 (22)
50	0,04 (15)	0,17 (14)	1,92 (13)	2,80 (13)
250	0,04 (7)	0,04 (7)	0,76 (7)	2,20 (7)

Dans ces conditions, on constate une augmentation de la formation de l'antitoxine en fonction de la quantité administrée lors de la deuxième injection. De même que dans le cas précédent, cette augmentation cesse et un plateau semble s'établir lorsque la

quantité d'anatoxine injectée atteint 10 unités. Là encore, seule une étude détaillée des points intermédiaires (zone 10 à 50 unités en particulier) permettrait de confirmer l'existence, toutefois très probable, d'un palier à ce niveau.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons étudié, au cours de ce travail, la formation d'antitoxine staphylococcique α chez le lapin, après deux injections d'anatoxine, lorsque varient la voie d'introduction de l'antigène, la durée de l'intervalle entre les deux injections et les quantités d'antigène injectées lors de la première ou de la deuxième injection.

Lorsqu'on élimine les animaux présentant une immunité naturelle et ceux qui, après une seule injection, ont un taux d'antitoxine anormalement élevé, il est possible, en multipliant le nombre d'animaux, d'obtenir une valeur moyenne du taux antitoxique qui ne soit pas trop influencée par les variations individuelles, qui sont fréquentes et marquées dans les conditions expérimentales choisies.

Dans ces conditions, les résultats suivants ont été obtenus :

1° Il ne semble pas que la voie d'introduction de l'antigène ait une influence significative sur le taux d'antitoxine obtenu. Les voies intradermique, sous-cutanée et intraveineuse nous ont, en effet, donné de ce point de vue des résultats sensiblement équivalents.

2° La durée de l'intervalle entre les deux injections influe, par contre, d'une façon marquée sur le taux d'antitoxine obtenu, celui-ci augmentant progressivement lorsque la durée de l'intervalle passe de deux à dix jours. Il semble ensuite qu'un plateau s'établisse, des intervalles de quatorze, vingt et trente jours ne permettant pas d'obtenir des taux d'antitoxine plus élevés.

3° Lorsque l'on fait varier les quantités injectées lors de la première ou de la deuxième injection, l'intervalle restant constant (dix jours), on constate les résultats suivants :

a) Lorsque l'on fait croître les quantités injectées lors de la première dose, la seconde restant constante (10 unités), le taux d'antitoxine croît en fonction de la dose administrée lors de la première injection. Lorsque celle-ci atteint 10 unités, il semble toutefois qu'un plateau s'établisse, des doses de 50 et 250 unités ne permettant pas d'obtenir un taux antitoxique plus élevé.

b) De même, lorsque l'on augmente les quantités injectées lors de la seconde dose, la première restant constante, le taux d'antitoxine croît en fonction de la dose administrée lors de la seconde injection. Cet accroissement cesse, cependant, lorsque la seconde dose atteint 10 unités, des quantités supérieures (50 et 250 unités) n'entraînant pas une production plus importante d'anticorps.

SUMMARY

IMMUNIZATION OF RABBITS BY MEANS OF TWO INJECTIONS
OF STAPHYLOCOCCAL α -TOXOID.INFLUENCE OF THE INTERVAL, OF THE DOSE, AND OF THE ROUTE
OF INOCULATION.

1° The route of inoculation does not seem to have a significant influence on the antitoxin titer obtained, as intracutaneous, subcutaneous and intravenous inoculations yield about the same results.

2° On the contrary, the interval between the two injections has a marked influence on the antitoxin titer : this titer progressively increases from two to ten days, but appears afterwards to remain unchanged, for longer intervals (14, 20, 30 days) do not allow to obtain higher titers.

3° If the inoculated doses of the first or second injection vary (the interval between them, 10 days, being unchanged), the results are as follows :

a) If the first dose increases (the second one remaining constant : 10 units), the antitoxin titer increases, being proportional to the amount of the first injection until an amount of 10 units; higher doses (50 and 250 units) do not allow to obtain higher titers.

b) The results are analogous when the amount of the second injection increases, the first one remaining unchanged; the maximum titer is obtained with 10 units in the second dose, higher amounts (50 and 250 units) yielding no better results.

SUR L'UTILISATION DU CITRATE DANS LA TRIBU DES *ESCHERICHIEAE*

par Szymona SZTURM-RUBINSTEN et Danielle PIÉCHAUD (*).

(C. R. R. S. et Institut Pasteur, Service de Microbie Générale)

Lominski et coll. [1], en 1947, démontrent par une méthode de mesure quantitative l'utilisation de l'acide citrique par *E. coli* (15 p. 100 en quarante-huit heures) quand ce germe est cultivé dans un milieu synthétique basique additionné de 0,1 p. 100 d'asparagine. Dans les mêmes conditions *Aerobacter* utilise 94 p. 100 d'acide citrique.

L'augmentation de la quantité d'asparagine de 0,1 à 1 g ne modifie pas les résultats.

Christensen [2], en 1949, propose un milieu pour rechercher la production d'hydrogène sulfuré et l'utilisation du citrate pour le diagnostic différentiel des Entérobactéries pathogènes et des coliformes. Il trouve que les membres du genre *Escherichia*, *Aerobacter*, *Paracolobacterium* et les *Alkalescents-Dispar* sont capables d'utiliser le radical citrate comme source d'énergie tandis que les *Shigella* ne le sont pas.

Hajna [3] qui, en 1955, travaille à quelques détails près avec le même milieu, a retrouvé les résultats signalés par Christensen.

Edwards et Ewing [4] utilisent la formule proposée par Christensen en supprimant le sesqui-citrate de fer ammoniacal pour la recherche de l'hydrogène sulfuré.

Voici la composition de ce milieu :

Citrate de sodium	3,0	g
Glucose	0,2	g
Extrait de levure (1)	0,5	g
Cystéine monohydrochloride	0,1	g
Phosphate monopotassique	1,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Rouge de phénol	0,012	g
Gélose	15	g
Eau distillée	1 000	ml

pH non ajusté. Autoclavé quinze minutes à 120°. Le milieu est acide : pH 6,4-6,5.

Toutes les Entérobactéries que nous avons cultivées ont très

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 14 mai 1959.

(1) Nous nous sommes servies d'autolysat de levure de bière Uclaf.

bien poussé sur ce milieu. Les *Shigella*, même *Sh. dysenteriae* 1, donnaient une culture abondante en vingt-quatre heures. Cette culture reste incolore, l'alcalinisation due selon Christensen [2] à l'utilisation du citrate ne se produit pas pour le genre *Shigella*. (observation un mois).

C'est probablement l'extrait de levure qui entre dans la composition du milieu qui permet à n'importe lequel de ces germes de croître.

Nous avons remarqué que les Entérobactéries comme *S. paratyphi* B, *Aerobacter*, les germes du groupe *Providencia* qui alcalinisent en vingt-quatre heures le milieu au citrate de Simmons, alcalinisent aussi rapidement le milieu au citrate de Christensen.

De même les *Pseudomonas aeruginosa*, certains *Bacillus*, les moisissures alcalinisent tous rapidement toute la surface du milieu de Christensen.

Nous avons ensemencé toutes les souches éprouvées sur le milieu au citrate incliné de façon à avoir un petit culot et une pente, par strie au milieu de la pente. La culture est également importante sur toute la surface, mais l'alcalinisation lente, en quarante-huit heures à trois jours, pour les *E. coli* et les germes du groupe *Alkalescens-Dispar* se produit d'abord dans l'endroit où la pente touche le culot et où l'eau de condensation s'accumule (le milieu est gardé en culot de 5 ml et incliné au moment de l'utilisation).

La même souche ensemencée par piqure dans le milieu en culot alcalinise d'abord aussi en quarante-huit heures à trois jours la surface ; c'est ensuite que l'alcalinisation progresse vers le fond.

Dans le même milieu non gélosé, les germes mentionnés plus haut poussent bien aussi : si le milieu liquide est réparti en tubes à hémolyse, *Aerobacter* l'alcalinise en quarante-huit heures, *Providencia* en trois jours. Les *E. coli* ou les germes du groupe *Alkalescens-Dispar* entre trois et cinq jours selon la souche.

Par contre, tous ces germes cultivés dans le même milieu réparti en couche mince en fioles Fourneau l'alcalinisent en vingt-quatre heures.

Cette série de constatations nous incline à penser que l'aérobiose joue un rôle important dans l'alcalinisation du milieu ou même dans l'utilisation du citrate, mais une autre observation complique l'interprétation des phénomènes. Une culture d'*E. coli* ou d'*Alkalescens-Dispar* ensemencée sur le milieu de Christensen en boîte de Petri (ou incorporée au milieu) ne produit aucune alcalinisation, même si l'observation dure un mois, tandis que dans les mêmes conditions le milieu est alcalinisé en vingt-quatre heures par nos deux souches témoins, un *Aerobacter* et un *Providencia* (citrate+ sur milieu de Simmons). Il semble que, pour *E. coli* ou *Alkalescens-Dispar*, une certaine humidité (qui existe

à la surface de la gélose en culot ou en bas de la pente) soit indispensable. Sur des géloses inclinées depuis plusieurs jours et non capuchonnées, qui ont séché, l'abondance de la culture n'est pas moindre, mais l'alcalinisation ne se produit pas.

Malgré les avantages du milieu liquide, nous pensons plus valable l'interprétation des résultats sur milieux solides, en particulier la présence d'un germe contaminant s'y décèle immédiatement d'après le seul aspect de la culture.

Pour notre travail courant nous nous servons du milieu de Christensen réparti en tubes de 17, incliné avec un petit culot en bas de la pente. Sur ce milieu nous avons cultivé 283 *Shigella*.

Ces souches comprenaient :

41 SOUCHES DU GROUPE A soit :

<i>Sh. dysenteriae</i> 1	8 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 2	8 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 3	4 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 4	5 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 5	3 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 6	1 souche
<i>Sh. dysenteriae</i> 7	6 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 8	2 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 9	2 souches
<i>Sh. dysenteriae</i> 10	2 souches

81 SOUCHES DU GROUPE B, soit :

<i>Sh. flexneri</i> 1	12 souches
<i>Sh. flexneri</i> 2	36 souches
<i>Sh. flexneri</i> 3	8 souches
<i>Sh. flexneri</i> 4	8 souches
<i>Sh. flexneri</i> 5	6 souches
<i>Sh. flexneri</i> 6	11 souches

52 SOUCHES DU GROUPE C, soit :

<i>Sh. boydii</i> 1	6 souches
<i>Sh. boydii</i> 2	7 souches
<i>Sh. boydii</i> 3	5 souches
<i>Sh. boydii</i> 4	3 souches
<i>Sh. boydii</i> 5	6 souches
<i>Sh. boydii</i> 6	1 souche
<i>Sh. boydii</i> 7	2 souches
<i>Sh. boydii</i> 8	1 souche
<i>Sh. boydii</i> 9	4 souches
<i>Sh. boydii</i> 10	5 souches
<i>Sh. boydii</i> 11	4 souches
<i>Sh. boydii</i> 12	2 souches
<i>Sh. boydii</i> 13	2 souches
<i>Sh. boydii</i> 14	2 souches
<i>Sh. boydii</i> 15	2 souches

109 SOUCHES DU GROUPE D :

Sh. sonnei 109 souches

Toutes les souches donnent une culture abondante sur le milieu de Christensen, mais sans jamais l'alcaliniser.

Nous avons également cultivé sur ce milieu 65 souches du groupe *Alkalescens-Dispar* réparties ainsi :

<i>Alkalescens-Dispar</i> 0-1	31 souches
<i>Alkalescens-Dispar</i> 0-2	2 souches
<i>Alkalescens-Dispar</i> 0-3	28 souches
<i>Alkalescens-Dispar</i> 0-4	2 souches
<i>Alkalescens-Dispar</i> 0-5	2 souches

Toutes nos souches *Alkalescens-Dispar* 0-1, 0-2, 0-4, 0-5 ont alcalinisé le milieu de Christensen ; ceci se produisait lentement, rarement vingt-quatre heures, plutôt quarante-huit heures après l'ensemencement : le bas de la pente commence à rosir, la coloration progresse pour envahir ensuite toute la pente. Sur 28 souches du groupe *Alkalescens-Dispar* 0-3, 22 alcalinisent le milieu, 6 donnent une culture incolore. Ces dernières sont tout à fait typiques pour leurs autres caractères biochimiques et leurs caractères sérologiques.

Dans notre collection nous avons un certain nombre de souches ayant des caractères biochimiques de *Shigella* mais non agglutinables. Vingt-trois sur 42 souches ont alcalinisé le milieu en question lentement, comme les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*. Ceci a un intérêt pratique incontestable pour le diagnostic rapide qui permet dans un certain nombre de cas d'éliminer les *Shigella* et d'orienter l'identification vers les groupes *Alkalescens-Dispar* ou *Escherichia*.

Sur 33 souches d'*Escherichia coli* cultivées sur ce milieu, 30 l'alcalinisent aussi lentement que les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*. ..

Trois souches de *S. paratyphi* A sur 5 éprouvées étaient positives au citrate-Christensen (tableau I).

Nous avons mesuré la densité de culture d'un *Aerobacter aerogenes*, d'*E. coli*, des germes du groupe *Alkalescens-Dispar* et de *Shigella sonnei* au cours de la croissance, ceci dans le milieu de Christensen non gélosé et parallèlement dans le même milieu non additionné de citrate. Les deux milieux étaient répartis en fioles Fourneau ; à chaque prélèvement la culture était aspirée dans une pipette et refoulée pour mélanger et aérer le milieu.

Les mesures de densité ont été effectuées avec un électrocolorimètre, sur des cultures mises à 37° et non agitées.

TABLEAU I.

Groupe	Nombre	Milieu au citrate de	
		Simmons	Christensen positif négatif
Alkalescens-Dispar			
0-1	31	(1)	31 (2)
0-2	2	-	2 -
0-3	28	-	22 6
0-4	2	-	2 -
0-5	2	-	2 -
total	65		59 6
Shigella possibles non agglu- tinables	42	-	23 19
E. coli	33	-	30 3
Para typhi A	5	-	3 2

(1) Pas de culture ; (2) Culture, pas d'alcalinisation.

On constate que, pendant un certain temps (cinq à sept heures), la courbe de croissance est la même dans les deux milieux, mais elle reste stationnaire dans le milieu dépourvu de citrate. Par contre, dans le milieu citaté, à partir d'un certain moment, la courbe continue à s'élever quand il s'agit de germes utilisant le citrate.

Nous n'avons pas remarqué de différences entre les courbes de croissance d'*Aerobacter aerogenes* et d'*E. coli* et les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*.

Les courbes de croissance de *Sh. sonnei* se superposent à peu près dans les deux milieux, avec ou sans citrate.

Nous avons essayé de remplacer l'autolysat de levure de bière par la vitamine B1 pure et la vitamine B2 (riboflavine).

Nous avons obtenu pour certaines souches une culture assez abondante, moins toutefois qu'avec l'extrait de levure, mais l'alcalinisation qui se produisait quelquefois apparaissait au plus tôt vers le dixième ou onzième jour d'incubation à 37°. Il est évident que l'apport de certains facteurs présents dans l'autolysat de levure est aussi indispensable que la présence du citrate dans le milieu, pour que celui-ci soit utilisé.

Peut-être l'utilisation du citrate n'est-elle pas complète pour les germes du groupe *Alkalescens-Dispar* et les *Escherichia coli*

(comme dans l'expérience de Lominski), car l'alcalinisation par *Aerobacter aerogenes* (souche positive sur citrate de Simmons) est beaucoup plus précoce et intense, comme nous l'avons déjà dit plus haut. En tout cas la présence de citrate n'intervient pas dans l'abondance de la culture, puisque toutes les souches éprouvées poussent abondamment sur le milieu de Christensen sans citrate, mais sans alcalinisation du milieu.

Pour étudier comme Lominski le rôle de l'asparagine dans l'utilisation du citrate par *E. coli*, nous avons utilisé la formule de Simmons à laquelle nous avons ajouté de l'asparagine (1 g pour 1 litre). Nous avons utilisé le rouge de phénol comme indicateur.

Sulfate de magnésium	0,2	g
Phosphate bipotassique	1,0	g
Phosphate mono-ammoniacal	1,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Citrate de sodium	2,0	g
Rouge de phénol	0,012	g
Asparagine (gauche)	1,0	g
Gélose	15	g
Eau distillée	1 000	ml
pH non ajusté		6,6

Ce milieu est réparti par 7 ml en tubes de 17, gardé en culot et incliné avec un petit culot et une pente, au fur et à mesure de l'utilisation. 18 souches d'*E. coli* sur 20 que nous avons tout d'abordensemencées poussaient et donnaient une culture abondante, et alcalinisaient le milieu en quarante-huit heures à quatre jours.

Nous avons ensuite cultivé sur ce milieu 24 souches du groupe *Alkalescens-Dispar* 0-1, 0-2, 0-3 positives sur le milieu au citrate de Christensen : 23 ont poussé avec alcalinisation du milieu en

TABLEAU II.

Souches	Nombre	Milieu au citrate de Simmons + asparagine	
		positif	négatif
<i>E. coli</i>	20	18	2
Coliforme	4	3	1
A-D 0-1	16	16	0
A-D 0-2	2	2	0
A-D 0-3	6	5	1

(1) Positif = culture, alcalinisation du milieu ; (2) Négatif = pas de culture.

quarante-huit heures à trois jours. Le tableau II montre que, comme sur le milieu de Christensen, il y a des *E. coli* et un *Alkalescens-Dispar* 0-3 qui n'alcalinise pas le milieu, mais sur le milieu à l'asparagine ces 4 souches n'ont pas poussé. Nous avons alors éprouvé sur ce milieu un certain nombre (84) de *Shigella* (tableau III).

TABLEAU III.

Groupe Nombre	Sérotype	Nombre	Milieu au citrate de Simmons + asparagine	
			positif (1)	négatif (2)
A-8	<i>Sh. dysenteriae</i> 1	2	0	2
	" " 2	2	0	2
	" " 5	1	0	1
	" " 7	3	1	2
B-24	<i>Sh. flexneri</i> 1	6	1	5
	" " 2	9	1	8
	" " 3	3	0	3
	" " 4	3	2	1
	" " 5	2	1	1
	" " 6	1	0	1
C-14	<i>Sh. boydii</i> 1	3	0	3
	" " 2	5	1	4
	" " 4	3	1	2
	" " 5	3	1	4
D-39	<i>Sh. sonnei</i>	39	23	16

La plupart des souches ne poussaient pas ou poussaient mal sur ce milieu.

Toutefois, certaines souches ont donné une culture abondante (voir tableau III) en alcalinisant le milieu en vingt-quatre heures à trois jours.

Nous avons alors préparé le même milieu à l'asparagine, mais non additionné de citrate (pH 6 non ajusté).

Nous avons constaté que les souches mentionnées plus haut poussent bien en alcalinisant très légèrement le milieu. Toute-

fois, la culture est nettement plus riche sur le milieu au citrate et l'alcalinisation beaucoup plus intense.

Les souches du groupe *Alkalescens-Dispar* et *E. coli* alcalinisent aussi légèrement le milieu à l'asparagine dépourvu de citrate.

C'est l'asparagine qui assure la croissance de tous ces germes, elle doit être consommée d'abord, d'où l'alcalinisation légère du milieu. C'est ensuite que le citrate, quand il est présent, est utilisé et le milieu devient de plus en plus alcalin, tandis que sans citrate le milieu reste légèrement alcalinisé. Cette alcalinisation n'augmente pas, même si les cultures sont observées plusieurs jours ou plusieurs semaines. Les courbes de croissance obtenues dans le milieu liquide de Simmons à l'asparagine additionné ou non de citrate ont les mêmes caractéristiques que celles obtenues à partir de cultures dans le milieu de Christensen. Il faut signaler que toutes les souches poussent moins bien dans le milieu liquide à l'asparagine que dans le milieu de Christensen gluocsé et avec l'extrait de levure.

Effectuée pour *Sh. sonnei*, la mesure de densité de culture dans le milieu à l'asparagine avec citrate et sans citrate montre la différence de densité due à l'utilisation du citrate par le germe.

Cette utilisation, que ce soit sur le milieu de Christensen ou sur le milieu de Simmons-asparagine, se fait peut-être à l'aide d'un enzyme adaptatif décrit par Karström [5] en 1938. Cet enzyme n'apparaît ou n'est capable d'agir que lorsque les souches sont en mesure de croître en présence de la source d'azote qu'on leur fournit.

Pour les *E. coli* et les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*, l'extrait de levure apporte certainement le facteur de culture approprié.

Pour certaines *Shigella* c'est l'asparagine qui le fournit, et non l'extrait de levure, malgré la culture sur le milieu de Christensen.

Il est encore possible que l'asparagine rende perméable la cellule microbienne et libère les enzymes présents. Elle exerce dans ce cas une action autre que l'extrait de levure.

Field et coll. [6] signalent le rôle de l'asparagine comme stimulant pour l'utilisation du glucose par *Propionobacterium freudenreichi*. Ils pensent que l'asparagine peut agir sur la perméabilité des cellules microbiennes.

Il semble que les souches qui sont capables de pousser sur le milieu grâce à l'asparagine sachent ensuite utiliser le citrate.

Peut-être, en fournissant aux souches qui ne poussent pas avec l'asparagine un facteur de croissance nécessaire, pourrait-on obtenir ensuite l'utilisation du citrate. Les recherches sur les

besoins nutritifs des *Shigella* sont encore fragmentaires et la plupart du temps limitées à une seule souche de *Sh. flexneri*.

Nous avons remarqué, en étudiant la fermentation du lactose par *Sh. sonnei* sur un milieu synthétique [7], que les *Sh. dysenteriae* 1 et *Sh. dysenteriae* 2 ne poussent pas sur ce milieu.

Le milieu au citrate et à l'asparagine ne permet pas de différencier les germes dans la tribu des *Escherichieæ*. Il montre, par contre, que l'utilisation du citrate est possible pour des germes variés à condition de les cultiver sur un milieu approprié (tableau IV).

TABLEAU IV.

Groupe	Milieu au citrate de		
	Simmons	Christensen	Simmons + asparagine
<i>Providenciae</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
<i>Bacillus</i>	+	+	+
Moisissures	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+
<i>Alkalescens-Dispar</i>	-	+	+
<i>Shigella</i>	-	-	- +

RÉSUMÉ.

Deux cent quatre-vingt-trois souches de *Shigella* éprouvées poussent sans alcalinisation sur le milieu au citrate de Christensen.

Sur 65 souches d'*Alkalescens-Dispar*, 59 ont alcalinisé ce milieu lentement en quarante-huit heures à trois jours. De même, 30 *E. coli* sur 33.

Vingt-trois sur 42 souches ayant les caractères biochimiques de *Shigella* alcalinisent également ce milieu. Ceci a un intérêt pratique pour l'identification et la classification des germes.

Toutes les souches qui alcalinisent le milieu au citrate de Christensen alcalinisent le milieu au citrate de Simmons additionné d'asparagine à 0,1 p. 100.

De plus, un certain nombre de *Shigella* appartenant aux différents sérotypes alcalinisent ce milieu, à condition qu'elles soient capables de s'y développer (32 sur 85 souches éprouvées).

Ceci prouve que l'utilisation du citrate est possible pour différents germes à condition de les cultiver sur un milieu approprié.

SUMMARY

UPTAKE OF CITRATE BY VARIOUS GERMS OF THE *Escherichieæ* TRIBE.

The 283 strains tested grow without any alkalization of the Christensen citrate medium. 59 out of 65 *Alkalscens-Dispar* and 30 out of 33 *E. coli* strains have slowly alkalized this medium (48 hours to 3 days).

The same result has been obtained with 23 out of 42 strains showing the biochemical properties of *Shigella*; this finding has a practical significance for the identification and classification of germs.

All the strains which alkalize Christensen's citrate medium alkalize Simmons' medium (citrate + 0,1 % asparagine).

Furthermore, a certain number of *Shigella* belonging to various serotypes alkalize this medium, if they are able to grow on it (33 out of 85 strains tested).

These findings show that citrate can be attacked by various germs, if they are grown on a suitable medium.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LOMINSKI (I.), CONWAY (N. S.), HARPERE (M.) et RENNIE (J. B.). *Nature*, 1947, **160**, 573.
 - [2] CHRISTENSEN (W. B.). *Res. Bull. Lab. Div. Colo.*, 1949, n° 1.
 - [3] HAJNA (A. A.). *Publ. Hlth Rep.*, 1955, **43**, n° 1.
 - [4] EDWARDS (P. R.) et EWING (W. H.). *Identification of Enterobacteriaceae*, Burgess, édit., 1955, Minneapolis.
 - [5] KARSTRÖM (E.). *Ergeb. Enzymforsch.*, 1938, **7**, 350.
 - [6] FIELD (M. F.) et LICHSTEIN (H. C.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 484.
 - [7] RUBINSTEN (S.) et THIBAUT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 104.
-

SUR LA PRÉPARATION D'UN IMMUNSÉRUM ÉQUIN ANTI-VENIMEUX AU MOYEN DES FRACTIONS NEUROTOXIQUES ISOLÉES DU VENIN DE VIPERA XANTHINA PALESTINAE

par S. KOCHWA, Y. IZARD, P. BOQUET et S. GITTER (*).

(Rogoff medical Research Institute,
Beilinson Hospital, Petah-Tiqva, et Institut Pasteur, Garches)

Plusieurs facteurs nocifs, dont un facteur générateur d'hémorragies et deux neurotoxines, ont été isolés par électrophorèse du venin de *Vipera Xanthina palestinae* [1].

Des chevaux rendus immuns à l'égard de ce venin par les méthodes usuelles, ont fourni un sérum qui neutralise, à petites doses, le facteur générateur d'hémorragies, mais dont l'action inhibitrice sur les facteurs neurotoxiques est très faible [1, 2].

Kochwa, Gitter, Strauss, de Vries et Leffkowitz [3] ont démontré récemment que des lapins auxquels on injecte des doses croissantes de venin de *Vipera Xanthina palestinae* tel quel, suivies d'injections d'un mélange des deux neurotoxines isolées de ce venin par électrophorèse, élaborent des anticorps anti-neurotoxiques. Les expériences dont nous résumons ci-dessous les résultats concernent la production, dans les mêmes conditions, d'un sérum équin capable de neutraliser à la fois les neurotoxines et le facteur générateur d'hémorragies du venin de *Vipera Xanthina palestinae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les quantités de neurotoxines recueillies par lavage des fragments de papier Whatman, où les antigènes ont émigré pendant l'électrophorèse, étant trop faibles pour immuniser un cheval, nous avons eu recours à la méthode de séparation électrophorétique continue (1) des constituants du venin de *Vipera Xanthina palestinae* à pH 8,6 et sous une tension de 210 à 240 volts. Le solvant utilisé, tamponné par le véronal et l'acétate de sodium, avait une force ionique de 0,05.

(*) Manuscrit reçu le 12 mai 1959.

(1) Appareil construit par M. Plotek de l'Université Hébraïque à Jérusalem.

Par ce procédé, 14 à 16 fractions protéiques ont été isolées en vingt heures à partir d'une solution représentant 0,5 g de venin sec. Les deux neurotoxines sont contenues, l'une dans la fraction anodique, l'autre dans la fraction cathodique du produit de l'électrophorèse. Ces deux fractions mélangées, dialysées contre une solution de NaCl à 0,85 p. 100, puis desséchées dans le vide à basse température représentent 10 à 12 p. 100 du poids total du venin soumis à l'électrophorèse.

Le cheval n° 318, auquel nous avons injecté en 1955, pendant cinq mois, à raison de deux injections par semaine, une quantité totale de 1,5 g de venin de *Vipera Xanthina palestinae*, et dont le sérum n'avait jamais été délivré pour l'usage thérapeutique en raison de sa faible activité, est immunisé de nouveau, après une période de repos de trois ans, par des injections sous-cutanées de doses croissantes du même venin (de 10 à 110 mg) à raison d'une injection par semaine pendant quinze semaines. La dose totale de venin administrée dans ces conditions est de 0,8 g. L'animal est alors saigné douze jours après la dernière injection d'antigène le 22 septembre 1958. Le sérum obtenu est désigné par les termes : sérum I. A partir de ce jour et pendant cinq semaines, on injecte, tous les trois jours environ, des doses croissantes : 25, 30, 35, ..., 120, 140, 160 mg d'un mélange des fractions neurotoxiques obtenues par électrophorèse, soit au total 0,920 g de produit sec. Ce cheval est saigné dix jours après la dernière injection et le sérum ainsi obtenu est appelé sérum II.

L'activité antitoxique des sérums I et II est alors mesurée en suivant deux méthodes différentes : la méthode décrite dans une publication antérieure [4] et qui consiste à injecter dans le péritoine de la souris blanche des mélanges en proportions variables de venin et de sérum, et une seconde méthode inspirée de la technique préconisée par Ipsen [4]. Cette seconde méthode consiste à injecter sous le volume de 0,5 ml dans la veine de la queue de souris blanches de 20 g, des mélanges préparés extemporanément de 0,25 ml de sérum antivenimeux et de quantités croissantes de venin.

Quelle que soit la technique suivie, on conserve les souris au laboratoire pendant vingt-quatre heures et on note les symptômes de l'intoxication et la durée de la survie de chacun de ces rongeurs.

RÉSULTATS.

La dose minima mortelle de venin de *Vipera Xanthina palestinae* (Ld 100) dans les conditions de notre expérience est 10 µg quand on introduit le venin par la voie veineuse, et 40 µg quand ce même venin est injecté par la voie péritonéale.

Lorsqu'elles succombent à la suite d'une injection intraveineuse

de venin, les souris d'épreuve ne présentent pas les lésions hémorragiques qu'on observe constamment après une injection intrapéritonéale du même venin. Nous avons constaté, d'autre part, que la toxicité des différents échantillons de neurotoxine recueillis par des électrophorèses successives n'est pas constante. Enfin, les doses minima mortelles des fractions neurotoxiques et hémorragipares pour la souris de 20 g éprouvée par la voie veineuse sont supérieures à la dose minima mortelle du venin tel quel, administré dans les mêmes conditions. En effet, alors que cette dose

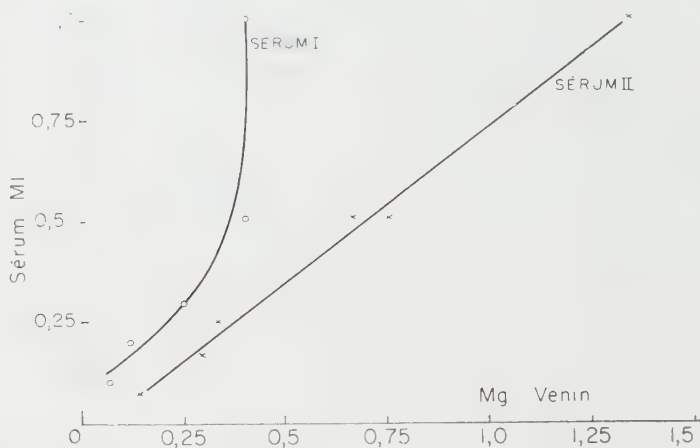


FIG. 1.

est 10 μ g, les quantités de neurotoxines et d'hémorragine nécessaires pour tuer la souris dans les mêmes conditions sont respectivement 30 et 50 μ g d'un échantillon de nocivité moyenne. Le mélange des deux fractions n'accroît pas leur toxicité. Cet affaiblissement des constituants du venin de *Vipera Xanthina palestinae* est, dans une certaine mesure, la conséquence de l'action du véronal. Nous avons vérifié ce fait en étudiant les variations de la toxicité des solutions de venin dans le milieu tamponné, comparativement aux variations de la toxicité du même venin dissous dans l'eau physiologique (NaCl, 9 p. 1 000).

Neutralisation par l'immunsérum spécifique du venin tel quel et des fractions toxiques isolées par électrophorèse. — L'action neutralisante des deux échantillons de sérum I et II mesurée en soumettant des souris à l'épreuve d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de venin et d'immunsérum est exprimée par les courbes de la figure 1.

La courbe correspondant aux résultats obtenus en utilisant le sérum I se relève rapidement. Celle qui correspond aux mesures de l'activité du sérum II exprime au contraire la relation linéaire qui existe entre les doses d'épreuve du venin et les quantités de sérum II nécessaires pour neutraliser ce venin. L'étude des symptômes dominant le tableau clinique de l'envenimation et l'examen des lésions anatomo-pathologiques des souris qui succombent permettent de déceler dans les sérums examinés la présence simultanée des anticorps capables d'inhiber les neurotoxines et le facteur hémorragipare ou de constater l'absence d'un de ces anticorps. En effet, les symptômes observés chez les animaux auxquels on a administré des mélanges de venin de *Vipera Xanthina palestinae* et de sérum I, traduisent essentiellement une atteinte du système nerveux quelle que soit la dose de sérum utilisée, mais on ne constate aucun symptôme nerveux, ni aucune hémorragie lorsque les souris reçoivent un mélange de plusieurs doses mortelles de venin et une quantité optima de sérum II.

TABLEAU I. — Mesure de l'action anti-toxique du sérum anti-venin de *Vipera Xanthina palestinae* à l'égard du venin tel quel (mélanges de venin et de sérum administrés par la voie veineuse à des souris de 20 g).

Sérum I :			Sérum II :		
0,25 ml			0,25 ml		
Venin (poids exprimé en µg par souris)	Nombre des souris mortes	Nombre total des souris éprouvées	Venin (poids exprimé en µg par souris)	Nombre des souris mortes	Nombre total des souris éprouvées
90	0/2		175	0/2	
100	1/2		200	0/2	
			225	3/4	
			250	1/2	

Cependant, lorsqu'on augmente dans ce mélange la dose d'épreuve de venin, les souris meurent en présentant à la fois des signes d'intoxication nerveuse et des hémorragies.

L'absence d'anticorps anti-neurotoxiques dans le sérum I et leur présence dans le sérum II peuvent également être démontrées

en injectant le venin et les sérums I et II par la voie veineuse, suivant la technique classique d'Ipsen [4]. Les résultats de cette expériences sont groupés dans les tableaux I et II.

TABLEAU II. — Mesure de l'action anti-toxique du sérum anti-venin de *Vipera Xanthina palestinae* à l'égard des fractions neurotoxiques isolées à partir de ce venin (sur la souris de 20 g éprouvée par la voie veineuse).

Sérum I :		Sérum II :	
0,25 ml		0,25 ml	
Fraction neurotoxique (pds exprimé en mg par souris)	Nombre des souris mortes / Nombre total des souris éprouvées	Fraction neurotoxique (pds exprimé en mg par souris)	Nombre des souris mortes / Nombre total des souris éprouvées
50	2/2	200	0/2
		250	1/2
		500	2/2

DISCUSSION.

Les résultats des expériences résumées dans cet exposé confirment ceux des expériences préliminaires de Kochwa, Gitter, Strauss, de Vries et Leffkowitz [3]. Ils démontrent que l'immunisation d'un cheval par un antigène extrait d'un venin de serpent, succédant à l'immunisation du même animal par des injections de doses croissantes du même venin administré tel quel, est une technique qui peut être appliquée à la préparation des divers sérums équins antivenimeux. Ils enseignent que les méthodes de mesure de l'activité neutralisante des sérums antivenimeux, fondées sur le principe de l'injection de mélanges de venin et de sérum en proportions variables, par la voie péritonéale, ou par la voie veineuse, peuvent être indifféremment utilisées pour apprécier le pouvoir neutralisant de l'immunsérum spécifique à l'égard de l'ensemble des facteurs nocifs du venin de *Vipera Xanthina palestinae*. Cependant, le procédé qui consiste à injecter les mélanges de venin et d'immunsérum par la voie péritonéale permet de mesurer séparément l'activité des anticorps inhibiteurs des neurotoxines et des facteurs générateurs d'hémorragies.

Utilisant pour mesurer l'activité des sérums anti-venimeux la technique définie par Ipsen [4], Boquet et Lehoul [5], contrairement à l'opinion émise jusqu'alors par la plupart des expérimentateurs, ont observé en 1948 que la ligne de neutralisation, par laquelle on exprime les résultats de l'expérience, n'est pas toujours une droite. Un phénomène comparable a été décrit, peu après, par Christensen [6] qui en a donné l'interprétation suivante. Lorsqu'une ligne de neutralisation se relève brusquement, comme c'est le cas pour la courbe qui exprime les résultats de nos essais faits avec le sérum I, on est autorisé à penser que le sérum dont on mesure le pouvoir neutralisant à l'égard d'un venin contre lequel il a été préparé, ne contient pas d'anticorps capables de neutraliser un facteur nocif du venin ou une quantité trop faible d'anticorps pour exercer une action inhibitrice sur ce facteur. Lorsque la dose d'épreuve de venin ajoutée au sérum spécifique correspond à une dose mortelle de ce facteur, le mélange des deux réactifs demeure toxique en dépit du fait que tous les autres constituants du venin sont neutralisés par le sérum. Les résultats des expériences résumées ci-dessus confirment l'opinion de Christensen.

Le fait qu'un certain nombre de souris parmi celles auxquelles nous avons administré, par la voie péritonéale, le sérum II en quantité trop faible pour neutraliser la dose d'épreuve de venin, présentent à la fois des signes d'intoxication nerveuse et des hémorragies, alors que les souris éprouvées dans les mêmes conditions par une injection du même venin mélangé au sérum I ne sont atteintes que de troubles nerveux, conduit à penser que la proportion des anticorps capables d'inhiber le facteur responsable des hémorragies et les neurotoxines, dans cet immunsérum II, est comparable à la proportion des antigènes correspondants dans le venin de *Vipera Xanthina palestinae*.

CONCLUSION.

En raison de son efficacité, la méthode que nous venons d'exposer sera avantageusement appliquée à la préparation des sérums anti-venimeux doués d'activité neutralisante à l'égard des divers antigènes toxiques d'un même venin, dans tous les cas où la méthode classique n'aura pas donné satisfaction. D'autre part, en autorisant une sélection des antigènes immunisants, cette méthode permettra d'assurer, dans les meilleures conditions, la préparation d'un immunsérum multivalent capable de neutraliser les divers constituants nocifs des venins appartenant à un même groupe immunologique.

SUMMARY.

PREPARATION OF AN ANTI-VENOM HORSE SERUM
BY MEANS OF NEUROTOXIC FRACTIONS ISOLATED
FROM *Vipera Xanthina palestinae* VENOM.

A potent antineurotoxin-containing serum against the venom of *Vipera Xanthina palestinae* was prepared in horses by immunization with electrophoretically separated neurotoxic venom fractions, subsequent to immunization with whole venom.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GITTER (S.), KOCHWA (S.), VRIES (A. DE) et LEFFKOWITZ (M.). *Am. J. trop. Med.*, 1957, **6**, 180.
 - [2] HADAR (H.), *M. D. Thesis*, The Hebrew University of Jerusalem, 1958.
 - [3] KOCHWA (S.), GITTER (S.), STRASS (A.), VRIES (A. DE) et LEFFKOWITZ (M.). *J. Immunol.* (sous presse).
 - [4] IPSEN (J.) *Bull. Hlth Organ. League Nat.*, 1938, **7**, 785.
 - [5] BOQUET (P.) et LEHOULT (Y.). *Rev. Immunol.*, 1948, **42**, 116.
 - [6] CHRISTENSEN (P. A.). *South African venoms and antivenoms*. The South African Institute for medical Research, édit., Johannesburg, 1955.
-

VARIATION NATURELLE DU VIRUS GRIPPAL DE TYPE A VIS-A-VIS DES INHIBITEURS SÉRIQUES DES ANIMAUX NORMAUX

par B. FAUCONNIER (*).

(Institut Pasteur, Centre National de la Grippe)

Au cours des quinze dernières années l'existence, dans le sérum d'animaux normaux, d'inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination virale, a été rapportée par de nombreux auteurs [1 à 12].

Nous avons entrepris une étude générale de ces inhibiteurs en examinant le pouvoir anti-hémagglutinant du sérum de neuf animaux normaux vis-à-vis d'un ensemble de 17 souches de virus grippal choisies comme représentatives des différentes épidémies apparues depuis l'isolement de la première souche en 1933.

La prédominance, puis la disparition du pouvoir inhibiteur du sérum de certains types d'animaux apparaissent ainsi d'une manière caractéristique, suivant les groupes d'années étudiés.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Souches de virus. — Elles sont groupées dans le tableau I. Toutes les souches sont régulièrement entretenues sur œuf par passages en série par voie allantoïque. C'est le liquide allantoïque frais et virulent lui-même qui sert d'antigène dans les réactions d'inhibition de l'hémagglutination.

Sérums d'animaux normaux. — Les sérums provenant de neuf espèces d'animaux normaux ont été utilisés. Les neuf espèces sont les suivantes : lapin, souris, poulet, porc, bovidé, mouton, cobaye, cheval et singe. Dans chaque espèce, les sérums de 10 animaux différents sont prélevés et mélangés. Ils sont filtrés sur bougie L3 et conservés à + 4° C jusqu'à utilisation.

Hématies. — Hématies de coq de race Leghorn prélevées avec 1 p. 100 de citrate de sodium, lavées trois fois en eau physiologique et mises en suspension à 0,5 p. 100 dans de l'eau salée (ClNa, 0,85 p. 100).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 14 mai 1959.

TABLEAU I. — Liste des souches de virus grippal de type A, B et D utilisées.

TYPE DE VIRUS	DÉSIGNATION DE LA SOUCHE	ANNÉE D'ISOLEMENT	PROVENANCE
A	Ws	1933	Angleterre
A	PR8	1934	U. S. A.
A	Weiss	1934-40 ?	U. S. A.
A1	FM1	1947	U. S. A.
A1	RHO	1947	U. S. A.
A1	Baratt	1947	Angleterre
A1	D48	1948	France
A1	Bargat	1951	France
A1	THI	1953	France
A2	Sing (Asie)	1957	Asie
B	Lee	1940	U. S. A.
B	BI	1949	Tchécoslov.
B	Crawley	1949	Angleterre
B	Qui	1951	France
B	Vig	1955	France
B	England	1953-55	Angleterre
D	Sendai	1953	Japon

Exécution de la réaction. — Les sérums, avant la réaction, sont soit chauffés à 60° C pendant une heure, soit utilisés tels quels. Ils sont dilués de demi en demi en eau physiologique (CINI, 0,85 p. 100), la dilution du premier tube étant de 1/20 dans 0,5 ml de diluant. Après adjonction dans tous les tubes d'une goutte de virus renfermant quatre unités agglutinantes de l'une des 17 souches étudiées, la réaction est complétée avec 0,5 ml de suspension globulaire dans chaque tube. La lecture se fait après trois heures de sédimentation à la température du laboratoire par détermination du dernier tube où l'inhibition de l'hémagglutination est complète. Dans les résultats, le chiffre donné est le dénominateur de la plus forte dilution de sérum donnant encore une inhibition totale.

RÉSULTATS.

Ils sont résumés dans le tableau II et les figures 1 et 2. Les souches de type A antérieures à 1945 sont peu sensibles aux inhibiteurs des sérums d'animaux normaux. Le sérum de lapin et le sérum de porc ont seuls une légère action anti-hémagglutinante.

La survenue des souches du type A1 s'accompagne d'un changement du type général des inhibiteurs. Ceux-ci apparaissent en plus grand nombre et à un taux plus élevé. Ils sont principalement du type bœuf-mouton. Mais il semble que déjà une souche de type A1 (Baratt) soit différente, puisque les sérums inhibiteurs appartiennent au groupe cobaye-coq-cheval-porc.

Le même groupe (cobaye-coq-cheval-porc) est caractéristique de la souche de type A2 (A/Asie/57).

Parmi les six souches de grippe B étudiées, aucune n'a été

inhibée à un taux supérieur à 1/40 par l'un quelconque des sérums des neuf animaux considérés.

La souche de type D (Sendai) est légèrement inhibée par le sérum de cobaye.

TABLEAU II.

Souches de virus	Sérums d'animaux normaux									
	Lapin	Singe	Bœuf	Cobaye	Coq	Mouton	Porc	Cheval	Souris	
	ne o	ne o	no o	no o	ne o	ne o	ne o	no o	no e	
A-WS 1933	80 0	0 0	0 0	0 0	0 0	40 0	0 0	0 0	0 0	
A-PR8 1934	40 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	80 0	0 0	0 0	
A-Weiss 1934-40	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
A'-FMI 1947	40 40	0 0	5120 1280	40 40	0 0	80 0	40 40	40 0	40 0	
A'-RHO 1947	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
A'-Barr 1947	0 0	0 0	0 0	40 320	640 640	0 0	0 40	320 0	0 0	
A'-M48 1948	0 0	0 0	2560 640	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
A'BURG 1951	160 0	0 0	5120 2560	40 0	0 0	160 0	0 0	0 0	40 0	
A'THI 1953	320 -	0 -	2560 -	40 -	0 -	160 -	0 -	0 -	0 -	
A/Asie 1957	80 80	40 0	0 0	2560 10240	1280 5120	0 0	320 1280	2560 5120	0 0	

DISCUSSION.

Les expériences décrites ci-dessus confirment les résultats obtenus partiellement par divers auteurs au fur et à mesure de l'apparition d'une nouvelle épidémie. Elles donnent, en les résument, un aperçu d'ensemble des variations naturelles du virus grippal du point de vue de sa sensibilité aux inhibiteurs du sérum d'animal normal.

A l'examen de ces résultats d'ensemble, plusieurs remarques peuvent être faites.

1° Il est particulièrement curieux de constater l'évolution continue de l'inhibiteur dominant, évolution qui entraîne tour à tour l'intervention de toutes les espèces animales domestiques principales : lapin-porc de 1933 à 1945, puis bœuf-mouton de 1945 à 1956, enfin épanouissement du type cobaye-cheval-coq en 1957, déjà peut-être annoncé par certaines souches antérieures (Baratt). Si l'on compare les souches THI (épidémie de 1951 en France) et Sing (épidémie asiatique de 1957), on constate immédiatement leur complète opposition, puisque les inhibiteurs bœuf-mouton

de la première ont complètement disparu chez la seconde. La souche THI appartient bien au type A1 (dont le représentant classique est la souche américaine FM1). Mais il apparaît possible (et cela devrait être étudié de nouveau en vue de confirmation éventuelle) que, parmi les souches qui sont « antigéniquement » classées dans le sous-groupe A1, il en existe certaines qui

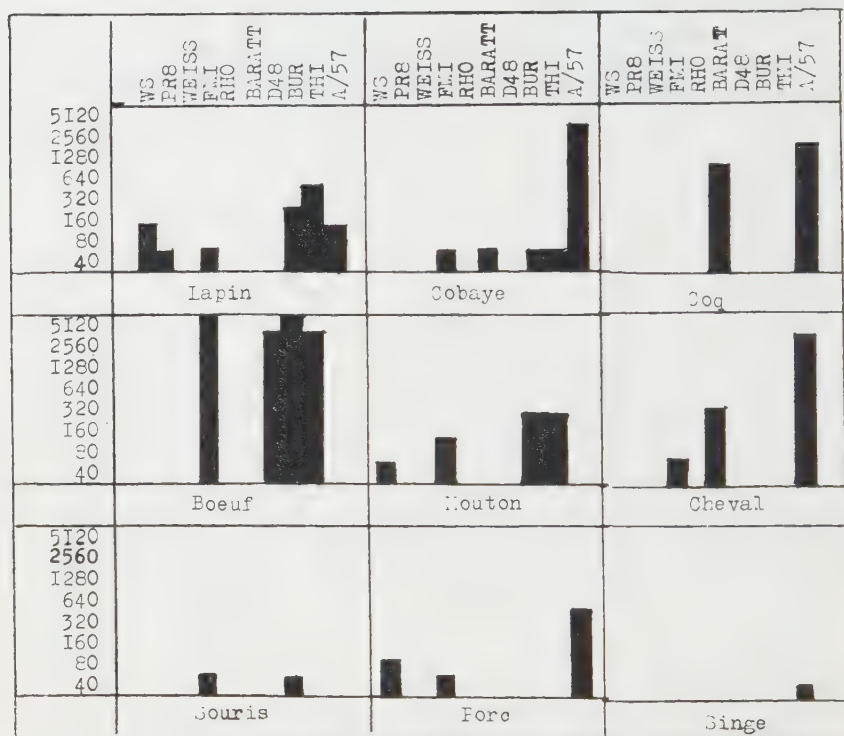


FIG. 1. — Titres inhibiteurs des sérums d'animaux normaux vis-à-vis des 10 souches de virus grippal.

puissent être différenciées des souches classiques (FM1) par la seule constatation du type d'inhibiteur qui leur est propre (exemple : Baratt).

2° En règle générale, les inhibiteurs sériques normaux disparaissent ou diminuent après chauffage du sérum à 60° pendant une heure. Pour la souche A/Asie/57, ce traitement produit l'effet inverse. Le chauffage augmente d'une manière parfois considérable le taux des inhibiteurs. Ce phénomène vient tout récemment d'être constaté et publié par Takatsy [13]. A ce point de vue encore, la souche Baratt semble se singulariser et suivre l'allure

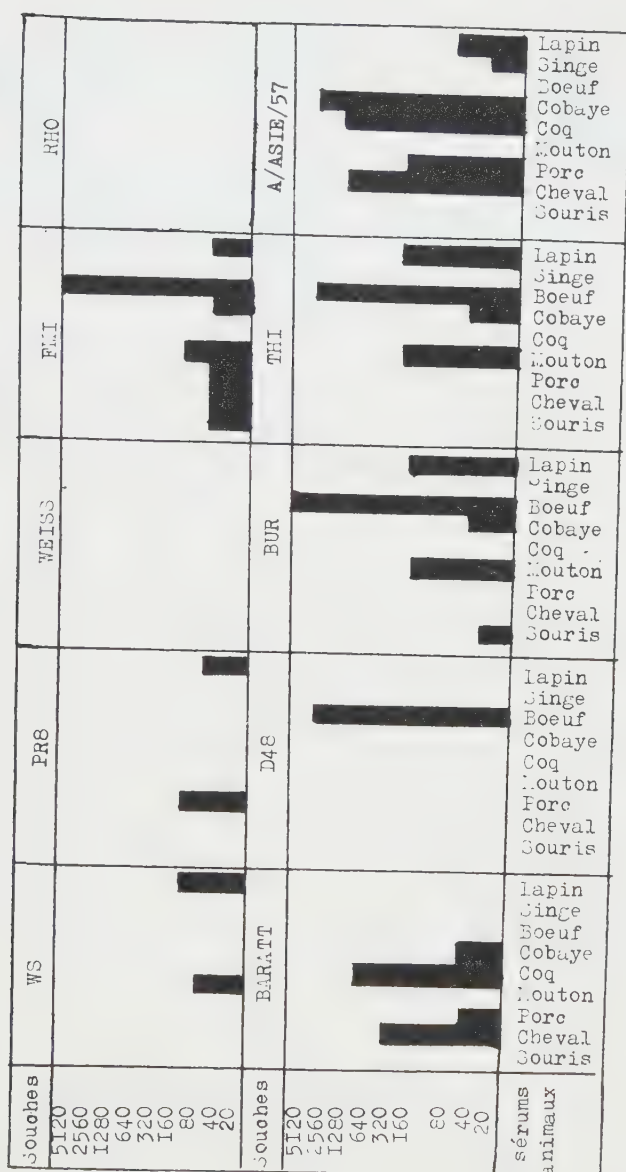


Fig. 2.

de la souche asiatique ; mais les taux enregistrés sont infiniment plus faibles. Un seul auteur, Mietkiewicz [14], avait déjà remarqué, sans en donner d'explication, un phénomène semblable : il s'agissait de l'augmentation du taux des inhibiteurs du sérum de rat blanc vis-à-vis de la souche C.1233 après chauffage à 60° C et même 100° C.

3° L'examen de la figure 1 montre le rôle de chaque animal dans le temps. Le lapin semble être l'animal le moins sensible aux variations de souches. L'inhibiteur est présent aussi bien pour les souches A que pour certaines souches A1 ou A2. Les sérums des autres animaux paraissent plus spécifiques d'une époque donnée, comme nous l'avions mentionné plus haut. Le sérum de porc, qui avait subi une éclipse pendant la période des souches A1, semble reprendre une certaine importance avec l'apparition de la souche asiatique. Enfin, le singe est certainement l'un des animaux les plus propices aux études antigéniques, car son sérum ne contient un taux élevé d'inhibiteurs non spécifiques pour aucune des souches étudiées.

4° Les variations antigéniques du virus grippal s'accompagnent d'une variation parallèle de sa sensibilité aux inhibiteurs des sérums normaux, puisque l'apparition d'un type antigénique nouveau entraîne l'apparition d'un nouveau type d'inhibiteurs. Il devient ainsi manifeste que l'étude antigénique d'une souche nouvellement isolée au cours d'une épidémie devra être dorénavant aussitôt complétée par la recherche de ses inhibiteurs sériques normaux. Dans une note ultérieure (Fauconnier, Lartitéguy et Barua [15]) nous donnerons les résultats de l'adaptation artificielle d'une souche A1 (FMI) à l'action inhibitrice et neutralisante du sérum normal de bœuf. Cette adaptation s'est révélée possible par culture répétée *in ovo* du virus en présence de quantités croissantes d'inhibiteurs sériques normaux « non antigéniques ». Par une méthode analogue (culture *in ovo* en présence de l'immunsérum homologue, une adaptation d'une souche de virus grippal à son inhibiteur « antigénique » a déjà pu être obtenue par Archetti et Horsfall [16]. Reste à savoir si, d'une part l'adaptation à l'inhibiteur « non antigénique » s'accompagne d'une modification antigénique du variant obtenu, et d'autre part inversement, si le variant antigénique produit par culture du virus en présence de l'immunsérum, présente des modifications quant à sa sensibilité aux inhibiteurs « non antigéniques » qui lui étaient propres. Ces recherches assez longues sont actuellement en cours.

L'existence de ces substances inhibitrices et neutralisantes pose des problèmes aussi importants que variés. Quelle est leur origine ? Ont-elles un rôle dans l'épidémiologie de la grippe ? Ces inhibiteurs sont-ils présents accidentellement, ou bien leur existence est-elle en rapport plus ou moins direct avec le virus grippal,

avec les épidémies passées ? L'immunité naturelle à l'infection grippale, constatée chez la plupart des animaux domestiques, est-elle en rapport avec l'existence de ces inhibiteurs ? Il est troublant de remarquer que seuls le singe et le porc (animaux normalement sensibles), ainsi que la souris (animal sensible après adaptation) ne possèdent que peu d'inhibiteurs ou n'en possèdent pas du tout, alors qu'il en est tout autrement avec le lapin, le bœuf, le cheval, le mouton, le cobaye et le coq. Le virus de la grippe du porc a été isolé depuis de nombreuses années ; celui de la grippe du cheval plus récemment. En ce qui concerne l'isolement de ce dernier, est-ce une coïncidence ou tout simplement parce que le virus humain a brusquement acquis des propriétés nouvelles lui permettant une adaptation à certains animaux autrefois réfractaires ?

On connaît aussi l'existence de gripes chez le mouton, le bœuf, la chèvre.

L'étude approfondie des inhibiteurs sériques normaux nous paraît d'un intérêt capital pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie grippale.

RÉSUMÉ.

Le pouvoir anti-hémagglutinant du sérum de huit animaux domestiques normaux (lapin, cobaye, porc, souris, bœuf, cheval, coq et mouton) et du singe (cynocéphale) a été étudié au moyen de l'agglutinine de 17 souches différentes de virus grippal de type A, B et D sélectionnées suivant leur date d'isolement. Aucun inhibiteur n'a été trouvé pour les six souches de type B étudiées. Pour les souches de type A, trois époques peuvent être distinguées. Les souches de la première époque (1933-1945) sont les souches A classiques ; elles sont inhibées par le sérum de lapin et celui du porc à un taux faible. La seconde époque (1946-1956) correspond aux souches de type A1. Les inhibiteurs homologues sont du type bœuf-mouton. La troisième époque (1957) commence avec la souche asiatique A/Asie/57, et les inhibiteurs associés se situent dans le groupe cobaye-coq-cheval-porc. Les inhibiteurs des deux dernières époques agissent à un taux parfois considérable.

Aucun inhibiteur n'a pu être décelé dans le sérum de singe pour les 17 souches examinées.

Seuls les inhibiteurs de la troisième époque sont considérablement augmentés par chauffage du sérum à 60° C pendant une heure.

La constatation du fait que les variations qualitatives des inhibiteurs accompagnent les variations antigéniques du virus grippal doit donner lieu à de nombreuses et intéressantes recherches. L'étude des inhibiteurs sériques normaux d'une souche de virus

grippal de type A apparait comme presque aussi importante que la détermination de la variété antigénique de cette souche. Elle doit la compléter.

SUMMARY

SPONTANEOUS VARIATION OF TYPE A INFLUENZA VIRUS TOWARDS SERUM INHIBITORS OF NORMAL ANIMALS.

The anti-hemagglutinating capacity of sera from nine normal animal species (rabbit, guinea-pig, swine, mouse, ox, horse, fowl, sheep and monkey) has been tested against the agglutinin of 17 different strains of influenza virus.

The strains (types A, B and D) were selected according to the date of their isolation.

The results show that no inhibitors are found for the six B type strains studied. As to A viruses, three periods could be distinguished.

During the first period (1933-1945) the strains were of a classical A type; they were inhibited by rabbit and swine sera at a low titer. The second period (1946-1956) corresponded to A1 type strains. Homologous inhibitors were of ox-sheep type. The third period started with the Asian strain (A/Asian/57), and the associated inhibitors were located in the guinea-pig-fowl-horse group. Inhibitors from the last two periods were sometimes active at very high titers.

No inhibitor has been detected in monkey serum against the 17 strains tested. Only the titers of the inhibitors of the third period were considerably increased by heating the serum at 60° C during 1 hour.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURNET (F. M.) et Mc CREA (J. F.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 277.
- [2] Mc CREA (J. F.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1946, **24**, 283.
- [3] FRANCIS (T. Jr). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 1.
- [4] HIRST (G. K.). *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 301.
- [5] ANDERSON (S. G.). *Austr. J. exp. Biol.*, 1948, **26**, 347.
- [6] SMITH (W.) et WESTWOOD (M. A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1949, **30**, 48.
- [7] ANDERSON (S. G.). *Austr. J. Sci.*, 1950, **12**, 147.
- [8] KLOSE (A.). *Z. Hyg.*, 1950, **131**, 46.
- [9] CHU (C. M.). *J. gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 739.
- [10] STULBERG (C. S.), SCHAPIRA (R.), ROBINSON (A.-R.), BASINSKI (D. H.) et FREUND (H. A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1951, **76**, 704.
- [11] SAMPAIO (A. A.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1952, **6**, 467.
- [12] BARTOLOMEI-CORSI (O.). *Bol. Ist. sieroter. milan.*, 1952, **31**, 45.
- [13] TAKATSY (Gy) et BARB (K.). *Nature*, 1959, **133**, 52.
- [14] MIETKIEWICZ (L.). *Med. Dosw. Mikrob.*, 1957, **9**, 403.
- [15] FAUCONNIER (B.), LARTIEGUY (R. M.) et BARUA (D.) [*sous presse*].
- [16] ARCHETTI (I.) et HORSFALL (F. L. Jr). *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 441.

PARTICULARITÉS VIROLOGIQUES ET SÉROLOGIQUES DE LA GRIPPE PANDÉMIQUE DE 1957

par A. A. SMORODINTZEV, G. J. ALEXANDROVA, T. J. LOUSANINA,
M. A. MOROZENKO et A. A. SELIVANOV (*).

*(Service de Virologie,
Institut de Médecine Expérimentale, Leningrad)*

La fin du mois d'avril 1957 vit apparaître en U. R. S. S. des cas sporadiques de grippe dans les collectivités importantes; le nombre des cas, relativement faible lors de la première vague (mai-juillet), diminua au mois d'août pour devenir très important en septembre-octobre (deuxième vague).

L'épidémie entraîna la plus forte morbidité de ces vingt-deux dernières années (Ancheles et coll.); d'après les données officielles 35 p. 100 de la population ont été atteints, mais pratiquement il faut compter 50 p. 100, et par endroits jusqu'à 90 p. 100. Après la deuxième vague (fin octobre 1957), le nombre des cas resta supérieur à la moyenne pendant six mois, au cours desquels 10 p. 100 des malades firent une grippe asiatique selon les examens de laboratoire.

On n'a pas observé la morbidité plus marquée pour la première enfance (0 à 2 ans), commune aux autres épidémies. La réceptivité fut homogène dans tous les groupes d'âges, avec une mortalité plus élevée chez les enfants de moins de 2 ans (18 pour 100 000 enfants de cet âge, contre 1,8 chez les enfants de 3 à 15 ans et 1,5 après 15 ans).

Nous exposons plus bas un bilan succinct des recherches entreprises au cours des première et deuxième vagues de grippe 1957, sur un groupe important de malades.

I. — Isolement du virus sur l'embryon de poulet et pouvoir pathogène pour l'homme et la souris.

D'après nos données, une variante asiatique du virus A, décelée en Chine en 1957, est à l'origine des deux vagues de l'épidémie et de la grande majorité des cas qui suivirent.

L'apparition de ce virus dont les particularités antigéniques et

(*) Manuscrit reçu le 30 juillet 1958.

biologiques étaient inconnues jusqu'ici (appelé en U. R. S. S. virus de type A2) peut s'expliquer par les variations naturelles incessantes qu'il a dû subir au cours de son adaptation aux facteurs immunologiques des malades (Smorodintzev, 1948 ; T. J. Lousanina, 1950). Ce processus s'accompagne de l'apparition de nouvelles variantes antigéniques, parmi lesquelles, tous les dix à quinze ans, prennent naissance de nouveaux sous-types sérologiques du virus de type A. Il est évident que ces modifications continuelles compromettent le succès des méthodes de diagnostic et de prophylaxie spécifique.

L'isolement du virus a été effectué au moyen de l'inoculation dans l'amnios à des embryons de 11 jours des sécrétions nasopharyngées des malades. Dans certains foyers on a pu l'isoler chez 50 à 75 p. 100 des malades examinés dans les premiers jours de la maladie. De nombreuses souches, parmi les 76 obtenues, furent isolées dès le premier passage ou après un passage supplémentaire, accompagnées de l'apparition rapide des anticorps. Faible au début, le titre hémagglutinant s'élevait lentement pendant l'adaptation aux œufs embryonnés et atteignait après le cinquième passage des exposants élevés, parallèles à ceux de la virulence qui atteignait 10^{-6} - 10^{-7} .

TABLEAU 1. — Pouvoir pathogène et toxicité du virus A2 (1957) pour la souris blanche.

Pouvoir pathogène du virus injecté	Souches de virus	Dilution du virus allantoïque inoculé à la souris			Modification de la virulence après passage du virus sur souris		Toxicité du virus allantoïque après inoculation (0,5cm ³ i.v.)
		1/1	1/160	1/100.000	Nombre des passages	Résultats après l'injection	
Souches pathogènes	1	+	+	+	5	—	3/12*
	2	+	+	—	3	—	2/10
	3	+	—	—	5	—	4/12
	4	+	—	—	3	—	3/8
	5	+	—	—	2	—	5/12
	6	+	—	—	2	—	0/6
Souches non pathogènes	7	—	—	—	3	—	0/8
	8	—	—	—	3	—	0/8

+, les souris ont succombé ; —, les souris ont survécu. * Numérateur : souris mortes ; dénominateur : nombre total de souris en expérience.

On notait la faible virulence des souches fraîchement isolées pour la souris. 20 p. 100 seulement des souches adaptées à l'embryon de poulet provoquaient la maladie et la mort de la souris après inoculation par voie intranasale sous anesthésie

à l'éther. Le pouvoir pathogène du virus s'affaiblissait régulièrement pendant l'adaptation à la souris, rendant difficile l'obtention de souches utilisables sur cet animal. On observait cependant le développement intense des souches isolées dans le tissu pulmonaire, sans lésions graves ni issues fatales. Ce faible pouvoir pathogène allait de pair avec une toxicité faible et inconstante, la souris ne mourant pas de façon régulière après introduction de 0,5 ml de liquide allantoïque très virulent (tableau I).

Nous n'avons pu obtenir de souche de virulence et toxicité constantes pour la souris.

Les recherches faites par O. M. Tchalkina sur le pouvoir vaccinant du virus A2 ont montré que de nombreuses souches adaptées à l'embryon de poulet étaient très pathogènes pour l'homme, provoquant chez nombre de sujets une grippe typique, facilement transmissible à l'entourage par contact. De telles souches ont nécessité des passages complémentaires répétés sur l'embryon de poulet afin de supprimer leur virulence pour l'homme.

Ces données mettent en évidence le haut pouvoir pathogène pour l'homme du virus pandémique, non seulement dans les conditions naturelles de propagation, mais aussi après adaptation à l'embryon, ce qui est très rare pour les souches des types A ou B isolées au laboratoire avant 1957.

II. — SENSIBILITÉ DU VIRUS

A L'ACTION DES INHIBITEURS THERMOSTABLES DES SÉRUMS NORMAUX DES ANIMAUX DE LABORATOIRE.

Toutes les souches de grippe asiatique qui ont été isolées peuvent être divisées en deux groupes : les souches apparentées au type A (avides) et les souches non apparentées [non avides] (1).

Une partie des virus du type asiatique (souches apparentées au type A) manifeste une haute sensibilité à l'action des inhibiteurs thermostables des sérums d'animaux normaux (cheval, lapin, cobaye, rat blanc). Dans les réactions d'hémagglutination-inhibition, le titre inhibiteur de ces sérums est généralement très élevé et correspond à des dilutions de 1/500 à 1/20 000. Le chauffage préalable des sérums à 56-100° C n'abaisse nullement, mais augmente même l'intensité de l'inhibition. Les inhibiteurs thermostables inhibent non seulement le pouvoir hémagglutinant des souches apparentées au type A, mais aussi le pouvoir virulent dans les cultures de membranes chorio-allantoïdes (selon la

(1) Le mot « apparenté » a été utilisé pour rendre en français le mot russe « avidnié » en tant qu'impliquant à la fois l'étroite similarité antigénique des deux types de virus (type A classique et type A₂) et l'intensité de la réaction antigène-anticorps qui en résulte (N. D. T.).

méthode de Horvath) et les embryons de poulet. Ainsi les souches de virus A2 apparentées au type A se distinguent nettement de toutes les souches connues des types A, B, C et D, dont le pouvoir infectieux est peu sensible aux inhibiteurs thermostables.

L'inoculation, aux embryons, d'un sérum de cheval normal riche en inhibiteurs, non seulement prévient la multiplication d'un virus apparenté au type A, mais supprime une infection préexistante, les membranes se débarrassant peu à peu du virus.

Les inhibiteurs thermostables sont insensibles à l'action de la trypsine, du zymosan, du CO_2 , éliminés en partie par l'addition d'un filtrat de vibron cholérique (RDE) et sont complètement détruits par le periodate de potassium ou de sodium.

Une autre partie des virus du groupe A2 (non apparentés au type A) reste complètement insensible à l'action des inhibiteurs thermostables, aussi bien dans les réactions d'héماغglutination-inhibition que dans la neutralisation sur cultures de membranes chorio-allantoides et sur embryons de poulets.

La nature des réactions si marquées des souches apparentées au type A ou non du virus A2 vis-à-vis des sérums normaux d'animaux et humains n'est pas encore élucidée. Le mécanisme d'apparition de souches apparentées au type A n'est pas étudié non plus ; en particulier on ne sait rien de la possibilité d'une formation artificielle des caractères propres à ces variantes au cours de l'isolement des souches « humaines » sur l'embryon de poulet. Les réactions d'héماغglutination-inhibition exigent l'emploi de souches de virus A2 insensibles aux inhibiteurs. On verra plus loin que cette réaction a exigé l'exclusion des hématies de poule et leur remplacement par des hématies humaines du groupe O.

III. — CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES.

Les souches isolées en 1957, réagissent nettement dans les réactions de fixation du complément pratiquées avec les sérums immuns des variantes antigéniques déjà connues des types A et A1, fait explicable par la présence chez le virus A2 d'un antigène soluble de type proche.

Les réactions croisées de fixation du complément avec des sérums de rats immunisés contre les anciennes souches de type A1 et surtout A, témoignent toutes d'une identité incomplète entre les antigènes de ces souches et ceux du virus A2. Néanmoins, les sérums de convalescents de la pandémie de 1957 ont suffisamment bien réagi aux antigènes A et A1.

La réaction d'héماغglutination-inhibition croisée avec des sérums monovalents de rats, dévoile chez les virus du groupe de 1957 une structure antigénique distincte de celle des virus du type A1 isolées de 1933 à 1956.

Lorsqu'on utilise pour cette réaction des souches apparentées au type A, les sérums sont débarrassés au préalable des inhibiteurs thermostables par le periodate de potassium.

Dans cette réaction, les souches du groupe A2, apparentées ou non au type A, ont des propriétés antigéniques proches et sont neutralisées assez nettement par les sérums hétérologues jusqu'à un titre complet ou partiel. Cependant, les virus de 1957 diffèrent nettement de n'importe quelle souche de type A ou A1 isolées de 1936 à 1956 (tableau II).

TABLEAU II. — Réactions croisées d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus A2 (1957).

Souches A2		Immunsérums de rats contre les souches de type:									
		A		A1			A2				
		1936	1949	1952	1954	1956	1957				
		A36	3711	44	324	349	149	150	157	158	SINGAPOUR
NON APPARENTÉES	132	—	—	—	—	—	1/4	1/8	1/2	1/8	1/8
	134	—	—	—	—	—	1/4	1/8	1	1/8	1/16
	138	—	—	—	—	—	1/2	1/8	1/2	1/4	1/4
	140	—	—	—	—	—	1/4	1/8	1/2	1/4	1/8
	141	—	—	—	—	—	1/4	1/32	1	1/8	1/8
	317	—	—	—	—	—	1	1/8	1	1/16	1/8
APPARENTÉES	150	—	—	—	—	—	2	1	2	1	1
	247	—	—	—	—	—	2	1	2	1	1/2
	Singapour	—	—	—	—	—	1	1	2	2	1

—, absence d'inhibition. 1/4 à 1/32, le titre de la réaction est 4 à 32 fois moindre qu'avec le sérum homologue. 1, le titre correspond à celui du sérum homologue.

2, le titre est deux fois plus élevé qu'avec le sérum homologue.

Les différences antigéniques indiquées au tableau II entre les souches apparentées et non apparentées au type A sont dues à l'utilisation pour cette expérience d'hématies de poules. L'emploi d'hématies humaines du groupe O aplanit les divergences et la structure antigénique de ces deux catégories de souches devient similaire.

IV. — RÉSULTATS DU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE D'APRÈS LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT.

Tous les antigènes frais des souches apparentées au type A et non apparentées décelaient l'élévation des anticorps des sérums de convalescents, lors des deux vagues de grippe 1957. L'antigène A1 donnait des résultats analogues et l'antigène A 1936 réagissait nettement moins bien (tableau III). Comme pour les

TABLEAU III. — Sensibilité des antigènes de divers types A, A1 et A2 dans la réaction de fixation du complément avec 101 sérums de malades (pandémie de 1957).

Intensité de l'augmentation des anticorps	ANTIGÈNES							
	A36	A1 24	Souches A2 fraîchement isolées					
			LÉNINGRAD				MOSCOU	
			1	2	3	4	Ikcha	Tchelabinsk
4	5	17	21	19	13	20	22	23
8	3	18	21	25	28	21	25	27
16	—	17	12	13	12	16	16	17
32	—	11	13	12	14	14	9	6
64	—	3	6	6	4	7	2	1
128	—	—	2	3	1	3	1	1
Résultats positifs en %	8	66	75	78	72	81	75	75

Les chiffres indiquent le pourcentage des sérums positifs.

TABLEAU IV. — Influence de l'âge sur la réaction de fixation du complément avec les différentes souches de virus A2 (pandémie de 1957).

Age	Nombre de malades	Nombre de résultats positifs avec la souche Singapour.				Moyenne d'augmentation des anticorps contre les différentes souches de type A.			
		0-2	4-16	32-64	% de résultats positifs	A-36	A1-53	A2-Singapour	A2-57
1-2-3	12	8	4	-	33	4,0	5,0	8,0	8,0
4-7	53	14	27	12	70	8,2	16,6	22,8	23,0
8-16	156	29	96	31	80	13,0	19,4	20,1	20,1
adultes	170	40	95	35	80	14,1	18,8	19,4	20,0

épidémies précédentes, les enfants en bas âge montraient des réactions plus faibles que les enfants d'âge préscolaire et scolaire [observation de M. A. Morozenko] (tableau IV).

Le pourcentage des résultats positifs de la réaction de fixation du complément reflète la dynamique de morbidité et atteignait un maximum (87,5 p. 100) au cours de la deuxième vague, pour descendre à 64 p. 100 en octobre, à 20-23 p. 100 en novembre-décembre 1957 et tomber à 10-12 p. 100 en janvier-mars 1958.

La haute sensibilité de la réaction de fixation du complément et sa faible dépendance de la structure antigénique du virus utilisé parlent en faveur de son emploi pour le diagnostic de la grippe dans les épidémies à venir lorsqu'apparaîtra une nouvelle variante du virus A2.

V. — RÉSULTATS DU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE
D'APRÈS LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION.

L'étude comparée des sérums de malades d'après la réaction de fixation du complément et de l'hémagglutination-inhibition montre l'insuffisance de cette dernière méthode lorsqu'on utilise des souches de virus A2 apparentées au type A, par rapport aux résultats obtenus en 1956 dans une étude analogue (tableau V).

TABLEAU V. — Résultats comparés du diagnostic d'après la réaction de fixation du complément et la réaction d'inhibition de l'hémagglutination au cours des épidémies de 1956 et de 1957.

Année	Méthode	Nombre de malades étudiés	Augmentation des anticorps (4 fois et plus)	Nombre des malades ayant une augmentation des anticorps de:								Coefficient d'augmentation des anticorps
				2	4	8	16	32	64	128	sans changement	
1956 (type A1)	RFC ⁽¹⁾	60	55 (91%)	2	17	23	8	5	1	1	3	11,2
	RIH ⁽²⁾	.	48 (80%)	4	16	16	8	6	2	-	8	12,5
1957 (type A2)	RFC ⁽³⁾	160	135 (85%)	6	33	39	33	21	7	3	18	18,8
	RIH ⁽⁴⁾	.	32 (20%)	47	20	9	3	-	-	-	81	3,7

(1) et (3), réaction de fixation du complément. (2) et (4), réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Cette insuffisance apparaît encore plus nette si on utilise des souches non apparentées au type A. Dans ce cas, les sérums couplés de malades ayant montré une augmentation des anticorps de quatre fois et plus d'après la réaction de fixation du complément, ne montrent pas d'anti-hémagglutinines pour le virus A2 et les résultats sont nuls. Les tentatives de neutralisation sur œufs des souches non apparentées au type A par ces mêmes sérums, sont également restées négatives. On pourrait croire qu'il n'existe pas d'immunité humorale chez les malades si la réaction de fixation du complément ne décelait des anticorps et si la réaction d'hémagglutination-inhibition pratiquée avec des souches apparentées au type A ne démentait une telle hypothèse. Il faut expliquer les résultats négatifs non par l'absence d'immunité, mais par les insuffisances de la réaction d'hémagglutination-inhibition.

L'isolement fréquent à partir de malades de souches non apparentées au type A a contribué à la large diffusion de l'idée que l'immunité antigrippale serait imparfaite pour les souches non apparentées au type A. On a supposé que ces souches ne réagissaient pas de façon ordinaire aux anticorps neutralisants

(V. M. Jdanov, V. D. Soloviev). Nos recherches ont montré l'inconsistance d'une telle supposition puisque les différences entre ces deux sortes de souches ne résident pas tant dans leur action réciproque sur les anticorps des sérums de convalescents que dans leurs particularités vis-à-vis des hématies de poules ou les tissus sensibles.

Nous avons supposé que les résultats négatifs des réactions d'hémagglutination-inhibition avec des souches non apparentées au type A provenaient non d'un manque d'anticorps ou d'une liaison virus-anticorps trop faible, mais de l'adsorption trop énergique du virus à la surface des hématies de poule qui arracherait le virus à une union plus fragile. La vérification de cette hypothèse fut menée parallèlement avec des hématies de poule et des hématies humaines du groupe O.

Les souches apparentées au type A et non apparentées ont montré une augmentation des anticorps dans les sérums couplés. Ainsi les résultats se rapprochaient de ceux de la réaction de fixation du complément, tant par le nombre de résultats positifs que par le titre moyen des anticorps.

Pour obtenir des résultats optima dans la réaction d'hémagglutination-inhibition avec des hématies humaines du groupe O, on a apporté les modifications suivantes :

1° Utilisation de souches non apparentées au type A, de virus A2.

2° Prolongation du contact sérum-virus jusqu'à douze heures au froid ou six heures à la température du laboratoire. Le contact prolongé entre les anticorps et le virus s'est avéré un important facteur d'amélioration de réaction pour n'importe quel virus des types A, A1 et B. Dans ces conditions le titre des anticorps s'élève de deux à huit fois (tableau VI).

TABLEAU VI. — Influence du temps de contact des sérums de convalescents avec le virus A2, sur les résultats de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (hématies humaines groupe O).

Température	Titre des anticorps du sérum après Contact avec le virus pendant					
	Au départ	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	16 à 18 h
18° 20°	0	1/10	1/10	1/40	1/160	1/160
4	0	1/10	1/10	1/20	1/80	1/160

Lorsque, pour cette réaction, on utilise des hématies humaines du groupe O, les souches apparentées et non apparentées au type A du virus A2 paraissent interchanger leurs rôles : les souches non apparentées au type A, les moins utilisables, devien-

nent les plus sensibles. Le gros avantage de ces dernières souches est leur parfaite insensibilité aux inhibiteurs thermostables non spécifiques des sérums étudiés, et qu'il ne faut pas mettre sur le compte d'un traitement préalable des sérums par des produits qui permettent de les éliminer, ce qui est obligatoire lorsqu'on travaille des souches apparentées au type A.

Le rôle déterminant du genre des hématies sur les résultats de la réaction d'hémagglutination-inhibition nous a donné une raison pour attribuer ses échecs lors de la pandémie de 1957 à une union plus forte entre les hématies de poule et le virus de souche apparentée au type A, que celle virus-anticorps.

Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement.

Nous avons introduit dans les mélanges de sérums hyperimmuns de convalescents 1 p. 100 d'hématies de poule ou d'hématies humaines O. Après deux heures de contact, on lavait les hématies sédimentées avec du sérum physiologique en centrifugeant à froid et on titrait le virus sur les embryons de poulet (tableau VII). Un mélange de sérums hyperimmuns et de virus homologues de type A1 servait de contrôle.

TABLEAU VII. — Adsorption des virus A1 et A2 sur les hématies d'homme et de poule.

Hématies	Titre du virus adsorbé sur les hématies (d'après les titrages sur embryons de poulet.)			
	Virus A2		Virus A1	
	Sérum normal	Sérum immun	Sérum normal	Sérum immun
Poule	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ³
Homme	10 ⁶	10	10 ⁶	0

Les hématies de poule adsorbent mille fois plus de virus que les hématies humaines, quoique en présence d'un sérum normal l'activité adsorbante des deux genres d'hématies ait été la même. Fait intéressant, des résultats concordants ont été obtenus avec le virus A1 isolé en 1949 ; là également, les hématies de poule adsorbaient plus intensément le virus que les hématies humaines à partir du mélange virus-anticorps. Il serait donc plus rationnel d'employer des hématies humaines du groupe O dans la réaction d'hémagglutination-inhibition en présence de n'importe quelle souche de virus.

La figure 1 représente les résultats comparatifs de la réaction d'hémagglutination-inhibition pour 65 sérums couplés de malades (positifs d'après la réaction de fixation du complément), de l'emploi d'hématies de poule ou d'hématies humaines et de souches de virus A2 apparentées ou non au type A. L'expérience a été

établie dans les conditions d'un contact prolongé des sérums avec le virus (dix-huit heures à froid).

Les sérums couplés de 65 malades ont donné des résultats négatifs avec les souches non apparentées au type A et les hématies de poule. L'utilisation d'une souche apparentée au type A fait s'élever jusqu'à 29 p. 100 le nombre des résultats positifs avec une liaison virus-anticorps 11,4 fois plus forte. C'est avec des hématies humaines et des souches non apparentées au type A que ces sérums ont donné le plus grand nombre de résultats

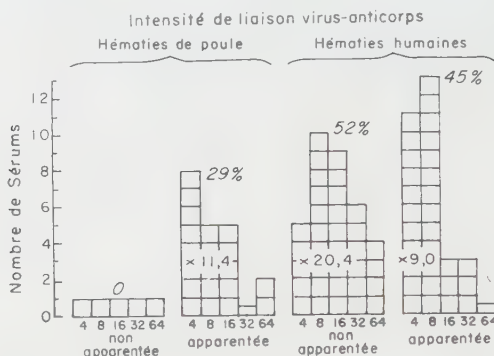


FIG. 1. — Résultats de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination avec le sérum de 65 malades (la réaction de fixation du complément est positive).

positifs (52 p. 100) avec un indice de liaison virus-anticorps de 20,4 fois supérieur.

Les souches apparentées au type A en présence d'hématies humaines O ont donné 45 p. 100 de résultats positifs avec le plus faible indice de liaison virus-anticorps. Ainsi, la réaction d'hémagglutination-inhibition réalisée dans des conditions optima donne de moins bons résultats que la réaction de fixation du complément. L'avantage de notre méthode de réaction d'hémagglutination-inhibition a été démontré par la vérification de 21 séries de sérums de chevaux hyperimmuns [Institut de Leningrad, 1957] (fig. 2). Elle a été réalisée en présence de souches apparentées ou non au type A, avec différents genres d'hématies. Avec les souches non apparentées au type A et des hématies de poule, le titre moyen est de 1/88 et de 1/460 avec des hématies humaines O. Avec les souches apparentées au type A, le titre moyen des mêmes sérums était plus fort, 1/708 en présence d'hématies de poule et 1/873 avec des hématies humaines. Cependant ces chiffres élevés peuvent être attribués à la présence dans les sérums expérimentés d'inhibiteurs thermostables non spécifiques, non éliminés avant la réaction.

La figure 3 permet de comparer les titres d'anticorps des sérums de 10 malades selon les réactions d'hémagglutination-inhibition (notre méthode) et la neutralisation en cultures de membranes

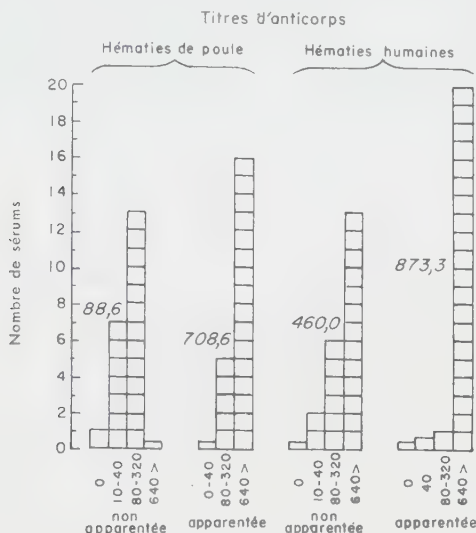


FIG 2. — Contrôle de l'efficacité de sérums anti-grippaux de chevaux (21 séries) par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

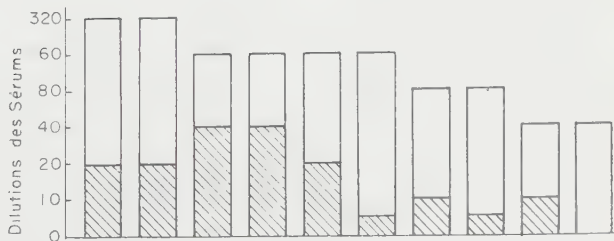


FIG 3. — Augmentation comparée des anticorps du deuxième prélèvement chez les 10 malades (virus type A2 1957) d'après les réactions d'inhibition de l'hémagglutination et de neutralisation (méthode de Horvath). Le titre des premiers sérums était inférieur à 1/5. Chaque colonne représente la réaction d'inhibition d'hémagglutination. La partie hachurée des figures correspond à la méthode de Horvath.

chorio-allantoïdes (d'après la méthode de Horvath). Le titre du premier échantillon était inférieur à 1/5. Le titre neutralisant de tous les sérums était considérablement inférieur au titre obtenu dans l'hémagglutination-inhibition.

A la lumière de ces données, cette réaction peut être utilisée

pour le diagnostic rétrospectif du virus A2, à condition d'y apporter les modifications que nous recommandons (hématies humaines du groupe O, souches non apparentées au type A, prolongation du contact sérum-virus). Les modifications proposées ont non seulement une signification particulière pour le diagnostic de la grippe A2, mais une importance d'ordre général pour les virus B, C et D. Nos expériences ont montré qu'elles permettent de trouver un titre d'anticorps de deux à quatre fois supérieur pour les autres types de virus.

CONCLUSIONS.

1° La participation, lors de la pandémie de 1957, d'une nouvelle variante antigénique et biologique du virus de type A, commune à tous les pays, a de nouveau démontré l'inconstance étiologique de cette infection et le rôle capital des transformations naturelles du virus de la grippe dans le développement d'épidémies importantes, en particulier de la pandémie de 1957.

2° Le virus a régulièrement stimulé le développement d'une immunité chez les malades, ce dont témoignent l'analyse de la morbidité des première et deuxième vagues, la rapide extinction des foyers indépendants et de la pandémie en général.

3° Le diagnostic fut aidé par la facilité d'isolement du virus sur les embryons de poulet et la haute sensibilité de la réaction de fixation du complément à l'aide des antigènes de la pandémie. Il faut préférer cette réaction à celle d'inhibition de l'hémagglutination et considérer cette méthode comme la méthode de base pour le diagnostic sérologique de la grippe.

4° Le virus de la grippe A2 est caractérisé par une série de particularités biologiques : virulence pour l'homme et les animaux de laboratoire, toxicité, propriété d'adsorption-élution sur les hématies, sensibilité aux inhibiteurs thermostables des sérums, etc.).

5° Il est difficile d'apprécier l'immunité acquise par la population en employant la méthode d'hémagglutination-inhibition avec des hématies de poule. Une liaison plus active du virus A2 au stroma des hématies de poule explique une absence apparente d'anti-hémagglutinines dans les sérums de convalescents. La différence est moins prononcée si on utilise des sérums d'animaux immuns.

6° L'affinité du virus A2 1957 pour le tissu embryonnaire de poulet ou les cultures de membranes allantoïdes (méthode de Horvath) explique les résultats peu nets des neutralisations avec des sérums de convalescents.

7° Les sérums humains et les sérums normaux d'animaux de laboratoire contiennent des inhibiteurs thermostables qui neutralisent en partie les antigènes hémagglutinant et neutralisant du

virus 1957 apparenté au type A. Il faut par conséquent utiliser des souches non apparentées au type A, c'est-à-dire insensibles aux inhibiteurs, dans les réactions d'héماغglutination-inhibition et de fixation du complément.

8° Pour pallier les insuffisances de la réaction d'héماغglutination-inhibition et élever sa sensibilité autant que sa spécificité, il convient d'utiliser les hématies humaines du groupe O et uniquement des souches non apparentées au type A du virus 1957, enfin de prolonger le contact du virus avec les sérums jusqu'à douze à dix-huit heures au froid, ou six heures à la température du laboratoire. Ces modifications permettent également d'améliorer les résultats de cette réaction pour les virus de la grippe isolés les années précédentes.

BIBLIOGRAPHIE

- HORVATH (S.). *Acta microbiol. Acad. Sci. Hungar.*, 1954, **1**, 481.
JDANOV (V. M.). *Vestnik AMN. SSSR.*, 1958, n° 3, 3.
LEN JUN-GUÈNE, FOUN GUEY-IN, TCHAGNE JUY-TCHEN et TAN FEY-FAGNE.
Voprossi virusol., 1957, n° 5, 28.
LOUSANINA (T. J.). *Dissertation JEM. AMN. SSSR.*, 1950, 22.
SMORODINTZEV (A. A.). *Voprossi medizinskoy virusologii*, 1948, **1**, 102.
SOLOVIEV (V. D.). *Med. Rabotnik*, 31 janvier 1958.
TJU TZI-MIN, CHAO TZUGNE et KHAOU GUEN-TJAGNE. *Voprossi virusol.*, 1957, n° 5, 278.
-

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 2 juillet 1959

Présidence de M. PRÉVOR.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

F.-M. Burnet et W. M. Stanley. — *The Viruses, biochemical, biological and biophysical Properties* (Volume 3, *Animal Viruses*). Academic Press, New York, London, 1959, 23 × 15,5 cm, 428 pages. Prix : \$ 12.

Ce livre est le troisième volume d'un ensemble qui doit réunir sous forme de traité nos connaissances sur les virus. Il paraît avant les volumes 1 et 2 (sous presse), ce qui explique que l'on y trouve l'étude détaillée de plusieurs virus et des exposés particuliers avant certaines des notions générales qui feront l'objet des deux autres volumes.

La qualité comme la notoriété des auteurs et collaborateurs du livre assurent à l'ensemble un intérêt de premier ordre et le lecteur y trouvera une masse considérable d'informations adaptées au stade actuel de nos connaissances.

D'une façon générale, la question des virus est envisagée sous l'angle des travaux les plus modernes, position justifiée par l'intérêt des recherches récentes et les progrès qu'ils ont permis d'accomplir. Elle conduit souvent néanmoins à sous-estimer, voire à négliger complètement les travaux classiques à partir desquels ont pu progressivement s'échafauder les notions qui sont l'objet même de l'ouvrage.

Les deux premiers chapitres, rédigés par F. M. Burnet, comportent des considérations sommaires sur la classification des virus et sur le mode d'infection des cellules par les virus. S. G. Anderson traite dans le chapitre suivant la question de l'hémagglutination en une revue très complète suivie d'une bibliographie abondante. Ce chapitre est suivi d'un court chapitre de Gottschalk sur la chimie des récepteurs des virus. Le chapitre V comprend un matériel considérable rédigé par F. B. Bang sur la morphologie de l'infection virale. Il est illustré de fort belles photomicrographies électroniques et donne un tableau détaillé des connaissances présentes sur un sujet qui évolue rapidement. Il est logiquement suivi par celui où Isaacs traite la biologie du développement intracellulaire des virus, chapitre excellent, qui

analyse en détail le mécanisme et les modalités de la multiplication virale. On regrettera cependant d'y voir fixer en 1952 la découverte du phénomène de l'éclipse, que les travaux de Levaditi avaient fait connaître depuis vingt-cinq ans. Schlesinger étudie les phénomènes d'interférence dans une bonne revue générale. Horsfall s'est chargé du chapitre difficile de l'inhibition de la multiplication des virus, où l'on trouve analysés les essais de chimiothérapie antivirale dont les résultats, si prometteurs qu'ils soient, restent jusqu'ici assez décevants. Fenner et Cairns ont étudié la variation de la virulence dans les conditions naturelles ou artificielles, question que les travaux de Fenner sur la myxomatose le rendaient particulièrement apte à traiter. T. Francis Jr expose de son côté la variation sérologique, c'est-à-dire, en fait, le problème de l'évolution antigénique des virus de la grippe. Au chapitre XI on retrouve traitées par Burnet, à propos des interactions génétiques entre virus, les brillantes théories de l'auteur. On peut leur reprocher, peut-être, de revêtir une certaine rigueur dogmatique et aussi de sous-estimer la part que la génétique cellulaire prend de toute évidence dans la génétique virale, qu'il est bien difficile de considérer de façon complètement indépendante. Andervont, à propos des problèmes concernant les virus des tumeurs, fait une revue générale étendue des travaux récents, ce qui lui donne l'occasion de faire des travaux de Gross sur la leucémie des souris une étude critique souvent dépourvue d'indulgence, car quelles que soient les explications théoriques que ce dernier ait pu donner des phénomènes observés, il est indiscutable que ce sont ses travaux qui ont donné l'impulsion aux recherches actuelles sur les leucémies animales, et il semble bien aussi qu'il ait été le premier à reconnaître la nature virale des tumeurs parotidiennes étudiées depuis par d'autres chercheurs comme Rowe ou Stewart. Dans un dernier chapitre, Kenneth Smith expose avec la lumineuse maîtrise qui lui est habituelle la question des virus des insectes, illustrée d'admirables micrographies électroniques.

Ce court aperçu des sujets traités dans ce volume en montre la valeur documentaire considérable ; son intérêt tient surtout à ce qu'il apporte une revue générale de presque tous les travaux récents, et qu'il condense en 428 pages certains des aspects les plus passionnants des problèmes des virus, tout en donnant une bibliographie qui, inégalement répartie selon les chapitres et leurs auteurs, permettra néanmoins au lecteur de se reporter aux sources principales.

Malgré quelques critiques de détail qui peuvent être apportées à cet ouvrage, il est indiscutable que sa parution marquera dans les livres fondamentaux sur les virus une étape comparable à celle qu'ont marquée des traités aujourd'hui classiques et déjà dépassés par l'évolution rapide de la virologie.

P. LÉPINE.

COMMUNICATIONS

**LE PHOSPHATE DE CALCIUM,
SUBSTANCE ADJUVANTE DE L'IMMUNITÉ****ÉTUDE DE LA RÉACTION TISSULAIRE LOCALE PROVOQUÉE CHEZ LE LAPIN**

par J.-C. LEVADITI, M. RAYNAUD, A.-R. PRÉVOT et A. TURPIN.

(Institut Pasteur)

Des essais de tolérance locale ont été réalisés sur le lapin afin de contrôler le mode de résorption du phosphate de calcium, substance adjuvante de l'immunité, spécialement préparée par Raynaud, Relyveld, Turpin et Mangalo [18], en vue de vaccinations au moyen d'anatoxines purifiées.

Ce sont les résultats d'expériences préliminaires que nous venons rappeler ici, essayant d'en dégager la signification en ce qui concerne le rôle éventuel du phosphate de calcium dans l'apparition de l'immunité.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL. — Dix lapins reçoivent chacun, dans le derme ou l'hypoderme, une suspension aqueuse contenant 1,18 mg de phosphate de calcium dans 0,25 ml. Cette suspension a été préparée suivant une technique antérieurement décrite [18].

Les lapins sont observés pendant trente jours. Les signes inflammatoires locaux restent discrets : une papule de 5 à 6 mm de diamètre entourée ou non d'une aréole rouge apparaît vers le troisième jour ; à la fin de la première semaine, elle se transforme en un nodule dermo-hypodermique qui s'indure et persiste sans changement du vingtième au trentième jour.

Des contrôles histologiques ont été effectués sur vingt prélèvements pratiqués à des dates variées.

Sans entrer dans le détail du compte rendu de chaque prélèvement, en voici la description histologique commune.

COMPTE RENDU HISTOLOGIQUE. — Le phosphate de calcium, injecté au lapin par voie dermique ou hypodermique, détermine des lésions cellulaires identiques, quel que soit le mode d'injection, dermique ou hypodermique.

Après fixation, la lésion, épaisse de 1 mm, forme une pastille de 4 à 5 mm de diamètre.

Les deux premiers jours, on constate une infiltration du derme par une substance amorphe, pulvérulente, qui imprègne les fibres collagènes et les dissocie avec afflux de polynucléaires neutrophiles (et éosinophiles chez un des lapins).

Les troisième et quatrième jours, cette substance, et les cellules qu'elle englobe, se nécrosent progressivement avec rétraction cellulaire, pycnose des noyaux et fuite des liquides ; une réaction histiocytaire s'amorce en périphérie.

Les sixième et septième jours, un granulome à corps étranger se constitue : histiocytes, macrophages et plasmods englobent des plages de phosphate de calcium précipité, visible sous forme de masses roses, opaques, granuleuses, dans lesquelles toute trace de cellule disparaît. Ces masses amorphes, inégales, sont séparées par des histiocytes et situées dans un tissu à nouveau imbibé de liquide.

Du huitième au trentième jour, ce granulome à corps étranger reste pratiquement inchangé ; autour des masses granuleuses, il devient plus ou moins riche en histiocytes macrophages et surtout en plasmods, qui encerclent parfois complètement les plages rosées à bords irréguliers. Le granulome ne contient pratiquement ni polynucléaires, ni plasmocytes, ni lymphocytes. La fibrose s'accroît, entoure et cloisonne ce foyer, lui constituant une enveloppe peu épaisse qui reste vascularisée.

Pendant toute cette évolution, ni l'épithélium malpighien de l'épiderme, ni les muscles profonds situés au contact de la lésion, n'ont été modifiés.

Le trentième jour, la sclérose s'est accentuée, elle englobe plasmods et macrophages qui marginent la nécrose. A l'intérieur de celle-ci apparaissent des granules inégaux de calcium précipité que l'hémalum colore en violet.

Pendant tout ce temps, durant lequel l'aspect histologique du granulome semble rester inchangé, la résorption macrophagique lente du phosphate de calcium et de la nécrose se poursuit. Ce granulome inflammatoire se comporte donc en véritable organite dont la fonction macrophagique continue est comparable à celle qui résorbe un pellet d'hormones.

DISCUSSION. — La réaction histologique constatée montre que le produit étudié est localement moins bien toléré que les anatoxines dont l'injection au lapin est suivie très rapidement d'un œdème et d'une vaso-dilatation auxquels succède un afflux discret de cellules inflammatoires, qui disparaissent en deux à trois jours sans reliquat histologique.

Quels arguments apporte cette étude du foyer inflammatoire local, consécutif à l'injection d'une substance adjuvante, en faveur d'une meilleure formation des anticorps et de l'obtention d'une immunité acquise [3] ?

De très nombreuses substances adjuvantes non spécifiques ont été étudiées depuis que le tapioca a été utilisé par Ramon [13] à cet effet.

Diverses substances minérales ont été employées en pratique dans la vaccination humaine et animale : l'alun [5], l'alumine [19, 20], le phosphate d'aluminium [6, 7, 8].

Le phosphate de calcium, préparé d'une façon différente de celle que nous avons indiquée [5], a été utilisé uniquement chez l'animal [9, 14, 15, 16, 21].

Les adjuvants huileux [17], avec ou sans mycobactéries [4], sont réservés à l'expérimentation.

L'effet favorable de ces adjuvants semble d'ailleurs limité à l'établissement de l'immunité primaire, comme l'a récemment rappelé d'Antona [4, 2].

Toutes ces substances adjuvantes provoquent des réactions locales dont les caractères histologiques sont voisins de la lésion que nous avons décrite plus haut.

Holt [8] les a observées après injection d'anatoxine diphtérique adsorbée sur alun ou sur phosphate d'alumine.

Une très abondante littérature a été consacrée aux réactions qui suivent l'injection de divers antigènes mélangés à l'adjuvant de Freund.

Il existe certainement une relation entre ce type de réaction inflammatoire locale, macrophagique, à type de granulome à corps étranger, et l'amélioration de la réponse immunitaire provoquée par ces adjuvants.

Son mécanisme exact est cependant loin d'être élucidé.

Des dosages d'anticorps pratiqués sur des lapins ayant reçu le même phosphate de calcium, mais sur lequel était adsorbée la toxine botulique C- β , ont montré à Prévot et Sillio [11] que le taux des anticorps spécifiques et la résistance à des doses croissantes de toxine s'élèvent régulièrement à partir du dixième jour chez ces animaux et atteignent progressivement des taux très supérieurs à ceux observés avec plusieurs injections de toxine brute.

Par ce procédé, Prévot, Raynaud, Turpin et Sillio [40, 42] protègent le vison en douze à quinze jours contre des doses d'épreuve allant de 20 000 à 40 000 DMM, alors que la vaccination par trois injections d'anatoxine brute précipitée l'immunise au bout d'un mois et demi, contre 100 DMM seulement.

Il ressort de cette comparaison que les anticorps apparaissent après la réaction inflammatoire aiguë du début, au moment où la lésion locale prend l'aspect de granulome à corps étranger. Par la suite, du dixième au trentième jour, les anticorps augmentent régulièrement de même que le taux d'antitoxine, cependant que la lésion histologique provoquée par le phosphate de calcium ne change ni de forme ni de composition cellulaire.

CONCLUSION. — L'étude de la réaction tissulaire produite chez le lapin au point d'injection d'un gel de phosphate de calcium utilisé comme substance adjuvante de l'immunité, montre qu'un granulome à corps étranger se constitue en quelques jours autour de l'inoculat. Il dure plusieurs semaines et assure une résorption lente et continue du produit injecté.

SUMMARY

CALCIUM PHOSPHATE, AN ADJUVANT IN IMMUNITY.

STUDY OF THE LOCAL TISSULAR REACTION INDUCED IN RABBITS.

The tissular reaction induced in rabbits at the injection point of a calcium phosphate gel, used as an adjuvant, has been studied. A foreign body granuloma appears in a few days around the inoculum; it persists several weeks and allows a slow resorption of the injected material.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANTONA (D. b') et PIAZZI (S. E.). *Ann. Sanita pub.*, 1956, **17**, 307.
- [2] ANTONA (D. b') et PIAZZI (S. E.). *Ann. Sclavo*, 1959, **1**, 163.
- [3] Cellular Aspects of Immunity. *Colloque de la « Ciba Foundation »*, Royaumont, 3-5 juin 1959 (à paraître).
- [4] FREUND (J.) et MAC DERMOTT (K.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1942, **49**, 548.
- [5] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 37.
- [6] HOLT (L. B.). *Lancet*, 1947, **252**, 282.
- [7] HOLT (L. B.). *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 335.
- [8] HOLT (L. B.). *Developments in diphtheria prophylactics*, W. Heinemann, édit., Londres, 1950.
- [9] PAPPENHEIMER (A. M. Jr.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 263.
- [10] PRÉVOT (A. R.), RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et SILLIOT (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 1632.
- [11] PRÉVOT (A. R.) et SILLIOT (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 208.
- [12] PRÉVOT (A. R.), MONTLOIN (R. J.) et SILLIOT (R.). *Bull. Acad. vétér.*, 1959, **32**, 147.
- [13] RAMON (G.). *Rec. Méd. vétér.*, 1925, **101**, 349.
- [14] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **47**, 339.
- [15] RAMON (G.) et LEMÉTAYER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 173.
- [16] RAMON (G.), DESCOMBEY (P.) et LEMÉTAYER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **46**, 444.
- [17] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et RICHOU (R.). *Rev. Immunol.*, 1937, **3**, 202.
- [18] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.
- [19] SCHMIDT (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 765.
- [20] SCHMIDT (S.) et STEENBERG (E.). *Acta path. microb. scand.*, 1936, **13**, 40.
- [21] WADSWORTH (A.), QUIGLEY (J. J.) et SICKLES (G. R.). *J. inf. Dis.*, 1937, **61**, 237.

L'INFLUENCE DE PLANTATIONS D'EUCALYPTUS AU MAROC SUR LA MICROFLORE ET L'HUMUS DU SOL

par J. POCHON, H. DE BARJAC et FAIVRE-AMIOT.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Dans une population forestière naturelle un équilibre climacique s'établit entre celle-ci, le type pédologique, le climat général et le climat local d'orientation, l'altitude..., etc. Cet équilibre climacique détermine et inclut, tout à la fois, le type d'humus et son évolution, donc aussi, dans une large mesure, l'équilibre même et la nature de la microflore tellurique (Lavergne [1]). Pour autant que se maintiennent constantes les conditions locales, l'équilibre se maintient aussi.

Il en va tout autrement des implantations forestières artificielles ; si le peuplement imposé n'est pas en équilibre avec l'ensemble des

conditions locales, des perturbations très importantes surviennent, surtout dans les mécanismes régulateurs de l'humification, avec baisse des rendements forestiers et dégradation plus ou moins rapide du sol.

C'est un exemple de ce fait qui est rapporté ici. Il s'agit d'implantation d'eucalyptus (*E. camaldulensis* et *E. gomphocephala*; 1 000 plants/Ha) en Afrique du Nord (Maroc, Vallée de la Marmora et plaine du Rharb). Les caractères régionaux essentiels sont les suivants.

Climat: chaud, semi-aride; avec deux saisons, chaude-sèche et fraîche-humide.

Sol: originellement landes à *Ormenis*, de profil complexe; horizon sableux reposant sur horizon argilo-gréseux compact; sous un A_0 de 1 à 2 cm (litières de feuilles), un A_1 de 10 cm légèrement humifié, reposant sur un sol minéral, avec lessivage important de tout le profil pendant la saison des pluies; pH oscillant entre 6 et 7.

Evolution humique: la litière représente de 2 à 4 kg/m² (C/N: 40 à 80) pour un peuplement de dix ans; l'horizon immédiatement sous-jacent ne contient que des quantités extrêmement faibles de matières organiques (0,5 p. 100); on peut donc conclure à une dégradation très rapide de la matière organique sans formation d'humus, donc à une minéralisation brutale (pour les détails climatologiques, pédologiques et chimiques, voir Métro et de Beaucorps [2], de Beaucorps [3]). C'est par conséquent un phénomène biologique qui est en cause.

De fait, les analyses (microflore totale, mycoflore, groupements microbiens physiologiques des cycles de N et de C) ont montré une perturbation profonde de l'équilibre microbiologique (de Barjac et Pochon [4]).

Les résultats les plus saillants sont l'absence de fixateurs d'azote moléculaire aérobies (*Azotobacter*) et anaérobies (*Clostridium*), la présence d'une microflore cellulolytique aérobie (*Cytophaga* surtout, et *Cellvibrio*) extraordinairement active dans la litière et immédiatement en-dessous, enfin l'importance de la micropopulation d'Actinomycètes.

Ce déséquilibre de la microflore et, en particulier, l'absence d'*Azotobacter* n'étant pas imputable à une question de pH ni à une carence minérale, nous avons pensé à la possibilité d'effets antiseptiques ou antibiotiques.

De fait, les extraits aqueux de feuilles d'eucalyptus sont légèrement antiseptiques vis-à-vis des *Azotobacter*, mais il ne saurait s'agir que d'un phénomène accessoire. Les extraits de sols (extraits aqueux, par l'alcool, par l'acétone, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le benzène, l'éther de pétrole, l'alcool butylique...) se sont, par contre, montrés démunis de tout pouvoir inhibiteur, non seulement vis-à-vis des *Azotobacter*, mais aussi de divers microorganismes telluriques testés; mais on sait combien les substances antibiotiques sont facilement adsorbées et inactivées dans le sol.

Cependant notre hypothèse s'est surtout trouvé vérifiée par l'étude de souches d'Actinomycètes et de Champignons isolées des sols en question.

En ce qui concerne les Actinomycètes, toutes les souches appartiennent aux *Streptomyces* (60 souches); 8 d'entre elles se sont révé-

lées antibiotiques vis-à-vis des *Azotobacter*. Les souches de Champignons (50 souches) se répartissent de la façon suivante : 32 p. 100 de *Penicillium*, 20 p. 100 d'*Aspergillus* (dont les représentants des groupes *albus*, *flavus*, *niger*), 8 p. 100 de *Trichoderma*, 4 p. 100 de *Botrytis*, 2 p. 100 de *Fusarium* ; 34 p. 100 n'ont pas été déterminés (à noter cependant la présence de 1 *Cladosporium*, 1 *Scopulariopsis*, 2 ou 3 *Spheropsidale*). Parmi ces Champignons quelques souches se sont révélées actives vis-à-vis des *Azotobacter*, dont un *Penicillium* sécrétant de la patuline (1).

Tous ces tests ont été réalisés sur gélose à la pomme de terre glucosée, en déposant un fragment de culture du germe dont on veut éprouver l'antagonisme sur la gélose préalablement ensemencée avec le germe test ; on mesure le diamètre du halo clair éventuel.

Etant donné la perturbation assez large de la microflore des terres analysées, nous avons pensé que l'effet antibiotique des Actinomycètes et des Champignons de ces terres pouvait s'étendre à des espèces telluriques autres que les *Azotobacter*.

TABLEAU I.

ACTIVITÉ ANTAGONISTE	DES ACTINOMYCÈTES		DES CHAMPIGNONS	
	sur Bactéries	sur Champignons	sur Bactéries	sur Champignons
forte	14,2 %	17,8 %	10 %	0 %
moyenne	42,8 %	5,3 %	4 %	2 %
faible	12,5 %	30,3 %	2 %	14 %

Les résultats sont résumés dans le tableau I. Ils expriment le pourcentage du nombre des souches ayant une activité antibiotique dans les divers tests bactériens ou fongiques.

L'étendue du spectre d'activité antibiotique explique donc pour une certaine part le déséquilibre de la microflore et, en particulier, l'absence des fixateurs d'azote moléculaire.

CONCLUSION. — La minéralisation brutale de la matière organique avec formation insignifiante d'humus, sous peuplement d'eucalyptus, dans les conditions pédoclimatiques étudiées, est vraisemblablement en rapport avec un déséquilibre de la microflore tellurique : très grande activité des bactéries cellulolytiques aérobies et absence de fixateurs d'azote moléculaire ; les phénomènes d'antagonisme, dans lesquels Actinomycètes et Champignons jouent un rôle majeur, doivent être, pour une large part, responsables de ce déséquilibre. Mais la minéralisation accélérée est surtout en rapport avec les facteurs climatiques (insolation, température), car elle est plus grande encore lorsque la couverture est faible (sous clairière où le peuplement n'est pas assez dense). L'ombrage relativement faible du feuillage d'eucalyptus est donc certainement une des raisons pour lesquelles cette espèce n'est

(1) La patuline pure s'est d'ailleurs montrée inhibitrice à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$.

pas climacique dans les conditions pédo-climatiques de ces peuplements. On sait d'ailleurs l'importance de la couverture pour le maintien d'une activité biologique normale du sol dans les climats semi-arides, si bien que ce facteur se ramène finalement, lui aussi, à une question de microflore tellurique.

SUMMARY

INFLUENCE OF EUCALYPTUS PLANTATIONS ON THE MICROFLORA AND HUMUS OF SOIL IN MAROCCO.

The brusque mineralisation of organic matter with a very slight formation of humus in the pedo-climatic conditions of the study seems to be due to a lack of balance in the telluric microflora : a very high activity of cellulolytic bacteria and an absence of N binding bacteria. Phenomena of antagonism, in which Actinomycetes and Fungi play the main part, seem to be very important. But this accelerated mineralisation is above all due to climatic factors (exposure to sun, temperature). The shade of eucalyptus is a feeble one, and this certainly is one the reasons why this species gives no good results in the conditions studied.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAVERGNE (D.). *Bull. Service Carte Phytogéographique*, 1957, série A, 2, 63.
- [2] METRO (A.) et BEAUCORPS (G. DE). *VIII^e Congrès de Botanique*, Paris, 1954.
- [3] BEAUCORPS (G. DE). *XIIth Congres Union. intern. Inst. Rec. Forest*, Oxford.
- [4] BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 93, 517.

DEUX NOUVEAUX SÉROTYPES DE *SALMONELLA* : *S. MILLESI* (40 : 1 v : 1,2) ET *S. TCHAD* (35 : b : -)

par L. LE MINOR, M. THOME, P. PERREAU
et Ch. CHARIÉ-MARSAINES.

(*Institut Pasteur de Paris*
et Centre de recherches zootechniques du Tchad)

Ces souches ont été isolées à Fort-Lamy (Tchad) de ganglions mésentériques de bovidés, lors d'une enquête systématique sur la présence de *Salmonella* chez les animaux de boucherie.

Les caractères biochimiques suivants sont semblables pour les deux souches : elles ne possèdent pas d'uréase, ne cultivent pas sur milieu de Braun au CNK, ne protéolysent pas la gélatine, ne produisent pas d'indole. Elles possèdent une lysine-décarboxylase et font fermenter : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose, glycérol (milieu de Stern), D-tartrate de

sodium. Elles ne font pas fermenter: adonitol, sorbose, saccharose, inositol. Elles cultivent sur milieu au citrate de sodium de Simmons et produisent de l' H_2S . En milieu de Clark et Lubs la réaction au rouge de méthyle est positive et celle de Voges-Proskauer négative.

La seule différence a trait à l'inositol, qui est fermenté par *S. tchad* et ne l'est pas par *S. millesi*.

S. millesi est agglutinée au titre homologue par les sérums: 40 préparé avec *S. springs* (1/800), 1v préparé avec *S. london* phase 1 (1/6 400) et 1,2 préparé avec *S. typhi murium* phase 2 (1/12 800). La saturation fait disparaître toutes les agglutinines homologues de ces trois sérums.

S. tchad est agglutinée à 1/1 600 par le sérum O:35 préparé avec *S. adelaide*, et dont le titre homologue est 1/3 200. La saturation fait disparaître toutes les agglutinines. La suspension H est agglutinée à 1/6 400 par le sérum anti-b préparé avec *S. paratyphi* B (titre homologue 1/19 200). La saturation abaisse ce titre à 1/800.

Résumé. — Description de deux nouveaux sérotypes de *Salmonella* isolés au Tchad de ganglions de bovidés.

SUMMARY

TWO NEW *Salmonella* SEROTYPES: *S. millesi* AND *S. tchad*.

Isolation of two new *Salmonella* serotypes in the Tchad region, from bovine nodes.

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE SALMONELLA : SALMONELLA QUINHON (47 : z44)

par L. LE MINOR, P. R. EDWARDS, R. MILLE et D. DRÉAN.

(Communicable Disease Center, Public Health Service,
U. S. Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, Georgia,
et Instituts Pasteur de Paris et Dalat)

Cette souche a été isolée dans la région de Dalat (Viet-Nam) de copro-culture chez les geckos (*Leiolepis belliana guttata*), au cours d'une enquête systématique sur la présence des *Salmonella* chez les reptiles. Cette souche possède une lysine-décarboxylase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK, ne possède pas d'uréase, ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas d'indole. Le dégagement d' H_2S est abondant, sur milieu de Clark et Lubs les réactions au rouge de méthyle sont positives et celles de Voges-Proskauer négatives. Cette *Salmonella* fait fermenter en un jour: xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose, glycérol (milieu de Stern). Elle n'acidifie pas les milieux contenant adonitol, sorbose, lactose, saccharose inositol et salicine. Elle cultive sur milieu au citrate de sodium de Simmons et fermente le D-tartrate.

Sur lames elle est agglutinée par les sérums anti-O : 47 et anti-z. Aucun autre sérum anti-H de *Salmonella* ne provoque d'agglutination. Mais les passages en gélose semi-solide additionnée de sérum anti-z n'immobilisent pas la culture comme ils le feraient s'il s'agissait d'une souche z monophasique. En tubes elle est agglutinée à 1/12 800 par le sérum O : 47 préparé avec *S. kaolak*. La saturation enlève toutes les agglutinines de ce sérum. Une suspension H de *S. quinhon* est agglutinée à 1/1 600 par le sérum z préparé avec *S. poona* dont le titre homologue est 1/25 600. La saturation de ce sérum ne fait baisser ce titre que de façon négligeable. L'antigène H avait donc simplement des facteurs communs avec z, de même d'ailleurs qu'avec H₃₁ des *Arizona* qui est étroitement relié au z des *Salmonella*. Nous avons alors préparé un sérum O et un sérum OH en immunisant des lapins avec une suspension chauffée d'une part, une suspension formolée d'autre part de *S. quinhon*. Le sérum O agglutine à 1/1 000 *S. quinhon* et à 1/500 *S. kaolak*. La saturation par *S. kaolak* enlève toutes les agglutinines. Ceci confirme donc que l'antigène O est 47, ou plus précisément 47 a, 47 c [4].

Le sérum H agglutine à 1/8 000 *S. quinhon*, à 1/1 000 *S. poona* phase 1 (z). La saturation par *S. poona* ne fait baisser qu'à 1/4 000 le titre homologue. Ce sérum absorbé par *S. poona* phase 1 et par une suspension chauffée de *S. quinhon* fut ajouté à des géloses semi-solides dans l'espoir d'isoler la phase 1. Tous les ensemencements de ces milieux aboutirent à une immobilisation de la culture. La souche est donc monophasique et nous avons attribué le symbole z44 à son antigène H.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella S. quinhon* (47 : z44) isolé de lézards au Viet-Nam. Son antigène flagellaire est un nouvel antigène H qui a des rapports antigéniques avec z de *S. poona* phase 1.

SUMMARY

A NEW *Salmonella* SEROTYPE : *S. quinhon*.

Description of a new *Salmonella* serotype, *S. quinhon* (47 : z44) isolated from lizards in Vietnam. Its flagellar antigen is a new H antigen possessing antigenic relationships with z of *S. poona* phase 1.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] LE MINOR (L.), DARRASSE (H.) et NAZAND (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 94, 400.
-

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA* : *S. SPARTEL* (21 : d : 1,5)

par R. NÉEL, L. LE MINOR et Ch. CHARIÉ-MARSAINES.

(*Instituts Pasteur de Paris et de Tanger*).

Cette souche a été isolée de coproculture chez une couleuvre capturée aux environs de Tanger (Maroc). Elle ne possède pas d'uréase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK, ne protéolyse pas la gélatine (1), ne produit pas d'indole. Elle possède une lysine décarboxylase et fait fermenter : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, maltose, tréhalose. Adonitol, sorbose, lactose, saccharose, inositol, salicine ne sont pas fermentés, de même que le D-tartrate de Na (addition d'acétate de plomb après deux jours de culture). Le milieu au glycérol de Stern vire au violet en trois jours. Cette *Salmonella* cultive sur milieu au citrate de sodium de Simmons, produit de l'H₂S et donne sur milieu de Clark et Lubs une réaction de Voges-Proskauer négative et une réaction au rouge de méthyle positive.

Elle est agglutinée au titre homologue par les sérums O : 21 préparé avec *S. minnesota* (1/3 200), d préparé avec *S. typhi* (1/25 600) et 1,5 préparé avec *S. cholerae* suis var. *kunzendorf* (1/25 600). La saturation de ces trois sérums fait baisser les titres respectivement à 1/400, 1/200 et 1/200.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella*, *S. spartel*, isolé de couleuvre et de formule 21 : d : 1,5.

SUMMARY

A NEW *Salmonella* SEROTYPE : *S. spartel*.

Description of a new *Salmonella* serotype, *S. spartel*, isolated from a grass-snake, and characterized by the formula 21 : d : 1,5.

(1) Cette souche présente la particularité de ne pas liquéfier la gélatine au charbon dénaturée par le formol (méthode de Kohn-Lautrop) après 14 jours, alors que la gélatine ordinaire est liquéfiée en 3 à 5 jours.

ÉTUDE D'UNE SOUCHE D'EMPEDOBACTER ISOLÉE DE CRACHATS

par J.-F. BRISOU, A.-L. COURTIEU et D. GERMAIN.

(Ecole de Médecine de Poitiers et Institut Pasteur de Lyon)

Les affections humaines reconnaissant des *Chromobacterae* responsables sont encore mal connues. L'un de nous en a fait une revue générale en 1958 dans un article consacré aux chromobactérioses humaines [1]. Ces maladies ne sont pas moins intéressantes en médecine vétérinaire. Elles ont fait l'objet des travaux de Joubert et N'Guyen van Liem en 1957 [2] ; l'un de nous participe à des recherches analogues chez les animaux à sang froid avec Tysset, Vacher et Lenèfle [3, 4].

Voici l'observation d'une affection pulmonaire aiguë chez un enfant de 9 ans dans les crachats duquel fut isolée une bactérie chromogène.

D... (Serge), hospitalisé le 8 décembre 1958 à la Clinique Médicale Infantile de Lyon (Prof. M. Bernheim).

Pneumonie double pratiquement muette cliniquement, mais avec d'importantes opacités du lobe de Fowler gauche et du lobe inférieur droit. Herpès labial.

Evolution rapidement favorable avec pénicilline-elcosine.

Apyrexie en trois jours.

Régression radiologique rapide du côté gauche, plus lente du côté droit.

L'examen sérologique pour adénovirus, hémagglutinines à froid, grippe asiatique s'est révélé négatif.

L'étude de la bactérie chromogène a été faite en détail. En voici les résultats.

MORPHOLOGIE. — Bacilles de taille moyenne, extrémités arrondies, nombreuses formes courtes, coccoïdes. Ces germes sont absolument immobiles quelles que soient les conditions de température des cultures : 37°, 28°, 20° ou 6°.

On colore aisément la bactérie par les méthodes usuelles. Elle ne prend pas le Gram. Elle n'a ni spores, ni flagelles.

PHYSIOLOGIE — La Chromobactérie pousse entre 6° et 37°. L'optimum se situe à 28°. Elle est tuée en quelques jours à 50°.

Cultivé sur milieu VF glucosé, régénéré, le germe pousse abondamment sur toute la hauteur du tube en produisant des gaz.

COLONIES. — Surélevées sur la gélose. Bords entiers. Opaques. D'abord de petite taille, elles s'élargissent jusqu'au septième jour ; à ce moment on observe des bords lobés, un centre chagriné et l'apparition de colonies filles.

Les enduits microbiens sont jaune citron, puis jaune plus foncé, ils deviennent ocre jaune et parfaitement lisses. On observe cette pigmentation sur la gélose ordinaire, la pomme de terre glycinée, le sérum coagulé, la gélose au foie. Les milieux de culture ne prennent pas le colorant.

CARACTÈRES CULTURAUX. — Le germe cultivé sur tous les milieux usuels. En bouillon et eau peptonée : trouble uniforme avec ondes moirées, le microbe accepte 6,5 p. 100 de NaCl et donne une bonne culture en trois jours.

GLUCIDOLYSE. — Les sucres suivants sont attaqués : glucose, lévulose, galactose, arabinose, xylose, saccharose, maltose, tréhalose, lactose, raffinose, dextrine, salicine, mannitol. L'esculine est réduite.

On observe parfois une bulle de gaz avec le glucose notamment. L'attaque du lactose a lieu aussi bien à 1 p. 100 qu'à une concentration de 10 p. 100.

Adonitol, dulcitol, inositol ne sont pas touchés.

PROTÉOLYSE. — Assez active. Le germe attaque la gélatine, faiblement la caséine, le sérum coagulé, et très lentement l'ovalbumine (quinze jours). Le lait est acidifié, coagulé en six jours et peptonisé. Ajoutons enfin la sécrétion d'hémolysine active sur les hématies de cheval. Sur le milieu de Bordet et Gengou : colonies noircissant le milieu sans hémolyse.

Le germe n'est pas indologène, ne décarboxyle pas la lysine, il n'est pas uréolytique, alcalinise le citrate du milieu de Simmons, cultive sur KCN, donne une réduction des nitrates en nitrites, des traces d'H₂S vers le huitième jour sur gélose au plomb, une réaction des catalases positive tandis que celle des oxydases est négative. Le D-tartrate n'est pas attaqué.

Il fut cultivé sur d'autres milieux : sur azide de soude il ne donne pas de culture, sur milieu de Pike il pousse faiblement avec une réaction d'hémolyse, sur « SS » des colonies roses, sur milieu de Handley une pousse légère avec réduction du tellurite, sans halo. Enfin, sur le milieu hypersalé de Chapman le germe ne se développait pas. Tels sont les caractères morphologiques et culturels de la bactérie.

POSITION TAXINOMIQUE. — Par certains de ses caractères ce germe pourrait entrer dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Malgré son immobilité il se rapproche du genre *Cloaca*. L'impossibilité de l'identifier formellement à aucun genre de cette famille et la production abondante de pigment jaune nous conduisent tout naturellement à la tribu des *Chromobactereae*.

Cette *Chromobactereae* à pigment jaune étant immobile entre dans le genre *Empedobacter* [5]. On s'oriente vers le groupe des espèces protéolytiques, donnant une réaction des nitrites positive, glucidolytiques, acidifiant les milieux lactosés. Nous avons le choix, parmi les espèces actuellement connues et classées, entre : *Emp. ferrugineum*, *Emp. flavigena*, *Emp. idoneum*, *Emp. udum* et *Emp. uliginosum*.

Toutes ces bactéries sont des bactéries du sol ou des eaux.

Avec Tysset et Vacher [4] l'un de nous a eu récemment l'occasion d'étudier une souche d'*Emp. uliginosum* isolée chez une couleuvre (*Natrix natrix*). Cette souche se montra moins énergique sur les sucres, elle n'alcalinisait pas le citrate de soude, elle n'acidifiait pas le milieu de Clark et Lubs. Son pouvoir protéolytique était aussi beaucoup plus discret.

Les espèces *ferrugineum*, *idoneum* et *udum* sont elles aussi moins glucidolytiques.

Il faut donc nous arrêter au diagnostic d'*Empedobacter flavigena*. Ces germes sont considérés comme cellulolytiques lorsqu'on les isole de l'eau ou du sol. Mais nous savons qu'il s'agit là d'un caractère éphémère que les bactéries perdent rapidement dans les milieux de culture. Le passage dans des organismes vivants leur fait sans doute abandonner encore plus rapidement ce pouvoir.

DISCUSSION. — Il faut, bien entendu, considérer cet *Empedobacter* comme un germe de sortie au cours de la pneumopathie présentée par ce petit malade. On a déjà signalé la fréquence de *Serratia* [6] chez l'homme au cours de syndromes variés. Notre observation est donc une contribution à l'étude de ces bactéries saprophytes occasionnellement rencontrées en médecine ; germes appartenant à la vaste famille des *Pseudomonadaceae*, trop souvent considérés comme de simples curiosités ou souillures accidentelles. Leur étude complète leur recensement systématique permettront au fur et à mesure que se multiplieront les observations de porter à leur sujet des conclusions plus justes ; car il est bien certain que toute prise de position serait actuellement prématurée.

CONCLUSION. — Des crachats d'un enfant atteint d'une pneumopathie double, les auteurs ont isolé un germe chromogène, à pigment jaune, qu'ils classent dans le genre *Empedobacter* et qu'ils rapprochent de l'espèce *flavigena*. Ils donnent les caractères cultureux de cette bactérie que l'on rencontre habituellement dans le sol et les eaux. Cette observation est une contribution au recensement des germes saprophytes que l'on peut rencontrer au cours d'effections variées où ils s'associent aux germes de sortie. On ne peut encore porter aucun jugement sur la part qu'ils prennent dans la maladie. Le bilan de ces flores chromogènes ne semble pas cependant dénué d'intérêt.

SUMMARY

STUDY OF AN *Empedobacter* STRAIN, ISOLATED FROM SPUTUM.

A chromogenous strain, producing a yellow pigment, has been isolated from the sputum of a child suffering from double pneumonia. The authors consider this germ to belong to the genus *Empedobacter* and to be related to the *flavigena* species. They describe its cultural properties ; it is generally found in soil and water. These findings once more prove the presence of saprophytic germs in the course of various diseases ; it is still impossible to state their eventual part in the disease.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] BRISOU (J.). *Rev. Path. gén.*, 1958 **58**, 211.
[2] JOUBERT (L.) et N'GUYEN VAN LIEM. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*,
10, 341.
[3] TYSSET (C.), VACHER (B.) et DENÈFLE (J. P.). *Rev. Corps vét. Armée*,
1958, **14**, 54.
[4] BRISOU (J. F.), TYSSET (C.) et VACHER (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**
734.
[5] BRISOU (J. F.). *Les Pseudomonadaceæ*, Le François, éd., Paris, 1958
[6] MOLLARET (L.) et CHAMFEUIL (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 43.
-

**ÉTUDE CLINIQUE ET PATHOLOGIQUE
D'UNE ÉPIZOOTIE DE LA CARPE
PAR UN FLAVOBACTERIUM**

par J. MEYER, Ch. ROMOND et U. KEIFF.

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg)

Au printemps 1957 sévissait en Alsace une épidémie dans les rivières et les étangs, qui touchait les poissons de la famille des Cyprinidés, principalement les carpes et les barbus. Cette maladie est connue depuis 1928 en Allemagne, où elle a été principalement étudiée par Schaeperclaus [1], Wunder et Dombrowski [2].

Au premier stade de la maladie, on observe chez les carpes l'apparition de taches rougeâtres plus ou moins étendues au niveau des nageoires, sur la peau abdominale et sur la face dorsale, où elles apparaissent à travers les écailles. La maladie évolue rapidement ; après neuf ou quinze jours, il se forme de petits abcès ou des phlegmons qui percent en évacuant du pus. Ils peuvent guérir ou évoluer en formant de gros abcès. On peut avoir affaire à une septicémie aiguë amenant la mort en vingt-quatre heures, à un stade phlegmoneux, à une issue fatale au bout de trois à quatre jours ; on trouve également la formation d'ulcères chroniques qui peuvent guérir lentement ou devenir mortels entre les cinquième et dixième jours. Finalement, on note parfois une forme à abcès multiples s'ouvrant après cinq à dix jours et guérissant spontanément.

Sur les carpes mortes, on note l'aspect morphologique suivant des lésions :

Extérieurement, de nombreuses taches hémorragiques disséminées, des abcès au niveau des nageoires, une hypertrophie de l'anus fortement hémorragique, une exophtalmie marquée et, au stade plus avancé, un gonflement de l'abdomen. Par places, les écailles s'arrachent facilement, les ouïes sont rouges, laissant exsuder un peu de sang.

A l'autopsie, on note de nombreuses hémorragies internes et la présence de liquide d'ascite abondant. Nous avons également observé une forte hypertrophie du foie et des lésions hémorragiques au niveau des différents organes abdominaux et des poumons (fig. 1).

EXAMEN HISTO-PATHOLOGIQUE. — L'examen histo-pathologique des taches hémorragiques cutanées et des nageoires révèle une hypertrophie marquée des petites artérioles qui montrent par endroits une diapédèse des hématies. Puis s'installe un phénomène inflammatoire ; les vais-

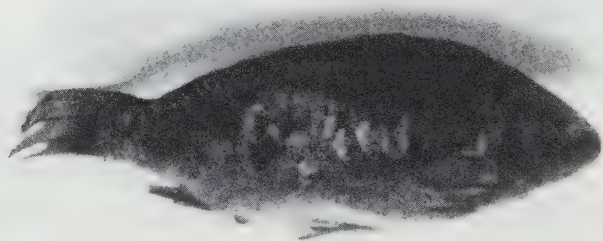


FIG. 1.

seaux sanguins superficiels éclatent et le sang diffuse dans le tissu conjonctif avoisinant. Cette infiltration amène la formation de lésions œdémateuses et de sortes de bubons. A l'examen histologique, on remarque à ce moment une infiltration des éléments sanguins dans le tissu interstitiel jusqu'à l'épithélium cutané où ils sont groupés en amas denses ou disséminés à travers le tissu épithélial fortement disloqué.

Dans la première phase de ce processus, l'épithélium reste intact et forme une sorte de membrane autour de la lésion inflammatoire. Plus tard, celle-ci cède à la turgescence intérieure et l'abcès crève. On voit alors apparaître au niveau des vaisseaux lésés un certain nombre d'histiocytes, d'habitude binucléés et à grande vacuole. Il s'agit de macrophages qui sont remplis de chromatine et d'autres déchets cellulaires. En même temps, on trouve un grand nombre de leucocytes, éléments de défense absorbant une partie des bactéries pathogènes et des débris cellulaires.

Dans le stade ultérieur, on voit plutôt une prédominance des lymphocytes, pouvant également fonctionner comme « microphages ». Si le phénomène inflammatoire se prolonge, les zones périphériques de ces abcès prennent un aspect gélatineux et deviennent oedémateuses avec de grandes vésicules remplies d'un liquide séreux. Ces vésicules peuvent atteindre un diamètre de plusieurs centimètres, allant jusqu'à celui d'une pièce de 5 francs. Au point de vue histologique, ces vésicules sont formées par des sortes de vacuoles plus ou moins grandes, localisées dans le tissu conjonctif de la peau. A l'intérieur de ces vacuoles, on trouve des éléments de fibrine, de rares hématies et de nombreux leucocytes. Les vésicules peuvent éclater et laisser une plaie ouverte qui peut évoluer vers des abcès chroniques. Ceux-ci sont formés de différentes zones tissulaires ; les plus grands peuvent atteindre les muscles profonds et montrent alors un centre rougeâtre entouré d'une couche de tissu conjonctif normal blanchâtre, entourée par du tissu conjonctif lâche de teinte rouge ; celle-ci est due à des phénomènes d'hémolyse. L'abcès chronique définitif est entouré d'un halo noir.

Chez certains poissons ces abcès peuvent guérir spontanément, par cicatrisation centrifuge. Chez la plupart des animaux par contre, ils se multiplient et peuvent évoluer pendant des mois jusqu'à l'issue fatale. Dans les cas de guérison, la cicatrisation peut amener une désorientation des nageoires ou de la queue, qui dévient alors de leur position normale.

A la température normale et au moment propice de l'épizootie, c'est-à-dire en juillet et août, ces vésicules et abcès se forment très rapidement, se fistulisent et éclatent dans un laps de temps de dix à quinze jours. A d'autres périodes, où les conditions atmosphériques et hydriques sont moins favorables, leur évolution est plus lente.

Expérimentalement, on peut obtenir encore un processus clinique différent, caractérisé par l'apparition de phlegmons ; ces inflammations du tissu conjonctif peuvent devenir envahissantes de proche en proche et aboutir alors à une destruction massive de ce tissu. Ces phlegmons sont caractérisés par l'intégrité de l'épiderme et du tissu conjonctif superficiel, alors que l'infection évolue en profondeur. Ils provoquent une septicémie au bout d'un à trois jours, à issue fatale rapide. Ce phénomène pathologique peut être obtenu expérimentalement avec facilité, surtout si l'on a à sa disposition des souches nettement pathogènes. On peut cependant l'observer sur les carpes infectées spontanément, particulièrement au printemps.

Les cas de septicémie aiguë peuvent se produire spontanément ou par inoculation. Les germes très virulents donnent des septicémies à évolution foudroyante, sans apparition de lésions histo-pathologiques de la peau ou du tissu conjonctif. La maladie peut donc rester inapparente et c'est seulement peu avant l'exitus que des phénomènes neurologiques indiquent l'intoxication par les poisons bactériens. Ces symptômes sont : troubles de coordination, convulsions, le poisson perd l'équilibre, il glisse sur le flanc ou flotte la tête en bas ; la mort survient alors très rapidement.

Nous avons ainsi donné la description des symptômes cliniques et pathologiques de cette infection épidémique de la carpe. Cette maladie atteint surtout les carpes adultes âgées de plus de trois ans. La forme

intestinale sévit particulièrement après l'hibernation, l'infection doit donc se faire au cours de l'hiver. Les formes à bubons et à abcès se remarquent à partir de juillet, alors que les cas malins, caractérisés par la formation de phlegmons ou de septicémies, sont les plus fréquents en mai et juin, de sorte qu'économiquement, le danger de la maladie se situe principalement à cette époque.

D'après notre enquête, l'épizootie a été importée en Alsace par des alevins d'origine allemande.

Il nous a semblé intéressant d'entreprendre l'étude du germe pathogène classé dans la famille des Pseudomonadacées. En effet, il existe actuellement une controverse assez serrée entre l'école française dirigée par Prévot et Brisou [3, 4], l'école américaine, adepte de la classification de Bergey [5], et l'école anglaise se basant sur celle de Topley et Wilson [6], au sujet de la taxinomie. D'autre part, en ce qui concerne l'agent pathogène de l'épizootie des Cyprinidés, les auteurs allemands qui ont décrit les premiers cette maladie au point de vue clinique et bactériologique, ne sont pas d'accord sur les propriétés morphologiques, biologiques et biochimiques de ces germes. Il existe d'après discussions entre Schaeperclaus et son école d'une part, et Dombrowski, Wunder [7] et leurs collaborateurs d'autre part. Ces raisons nous ont incités à entreprendre une étude exacte de cette Pseudomonadacée pour la comparer avec un certain nombre d'autres représentants de cette famille, gracieusement mis à notre disposition par Schaeperclaus, Lelliott et Lutz, auxquels nous exprimons ici nos remerciements.

Cette étude fera l'objet d'une seconde publication.

SUMMARY

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF AN EPIZOOTY IN CARPS, INDUCED BY A *Flavobacterium*.

The authors describe the clinical symptoms and a histopathological study of the disease, observed in Alsace. In a further paper, they will compare the isolated bacterium with other germs of this genus and will study its taxonomy.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCHAEPERCLAUS (W.). *Fischerei*, 1930, **28**.
- [2] DOMBROWSKI (H.). *Biol. Zentralbl.*, 1953, **72**.
- [3] MAGROU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 99.
- [4] BRISOU (J.). *Etude de quelques Pseudomonadacées. Classification*. Editions A. Baillet, Bordeaux, 1956.
- [5] BERGEY. *Manual of determinative bacteriology*. Editions de 1923, 1930, 1948.
- [6] TOPLEY et WILSON. *Principles of bacteriology and immunity*, 2 vol., 3^e édition, Londres, 1948.
- [7] WUNDER (W.). *Fisch und deren Hilfswissenschaft*, 1953, **2**, n° 5. *Der Fischbauer*, 1950, **4**, n° 2.

SENSIBILITÉ A LA RISTOCÉTINE DE QUELQUES SOUCHES MICROBIENNES

par A.-L. COURTIEU, A. BERTOYE et M^{lle} C. LONGERAY.

(Institut Pasteur de Lyon)

Ces dernières années la thérapeutique anti-microbienne fait appel de préférence aux antibiotiques à spectre limité. Bien entendu les drogues toxiques sont habituellement rejetées. Parmi celles-ci, cependant, il en est une dont l'utilisation peut être faite sans trop de danger sous surveillance médicale : la ristocétine (1).

La ristocétine est extraite des cultures d'un Actinomycète : *Nocardia lurida* [4]. Elle est composée de deux fractions appelées respectivement ristocétine A et B. C'est la fraction B qui présente le plus de qualités. Le spectre antibiotique couvre la plupart des germes Gram-positifs : cocci et bacilles sporulés ou non. Le produit est aussi actif sur le bacille tuberculeux, mais n'a aucune action sur les germes Gram-négatifs, sur les levures et champignons, ni sur les protozoaires.

Parmi les germes sensibles, c'est surtout l'entérocoque qui a retenu l'attention, car de nombreuses souches sont résistantes aux autres antibiotiques. Cette constatation pose des problèmes thérapeutiques très délicats, particulièrement au cours des endocardites à entérocoques, malgré les possibilités offertes par les associations d'antibiotiques. L'action sur les staphylocoques est aussi intéressante, car le nombre de souches résistantes aux autres antibiotiques augmente progressivement.

Mais l'emploi de cet antibiotique est limité par quelques effets toxiques : il provoque des nécroses locales et doit être utilisé seulement par voie veineuse (en perfusion lente), il peut agir sur la formule sanguine (neutropénie), ou sur le nombre des plaquettes (diminution notable). Ces accidents hématologiques ne dépassent pas 10 p. 100 des cas traités [2] et peuvent être prévenus par une surveillance appropriée. Enfin il faut signaler quelques cas de phlébites au voisinage du point d'injection.

Grâce à l'amabilité du Dr Y. Chabbert nous avons eu la possibilité d'étudier *in vitro* l'activité de cet antibiotique.

TECHNIQUE. — Nous avons recherché la sensibilité de 169 germes isolés au laboratoire, vis-à-vis de la ristocétine. La technique est celle des dilutions en gélose. Les germes sont ensemencés en stries courtes avec une pipette capillaire rodée. Les boîtes ensemencées sont déposées à 37°. La lecture est faite après vingt-quatre heures, puis confirmée

(1) Commercialisée par les Laboratoires Abbot sous le nom de Spontin (T. M.).

après quarante-huit heures. L'absence de pousse après quarante-huit heures nous donne le taux du pouvoir bactériostatique. Les concentrations de ristocétine ont été choisies en tenant compte du fait que les traitements habituels maintiennent des taux sanguins de l'ordre de 10 à 20 $\mu\text{g/ml}$ avec, pour des traitements forts, la possibilité d'atteindre 30 à 40 $\mu\text{g/ml}$ [3].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Nos résultats pour 167 souches sont consignés dans le tableau ci-joint. Il faut y ajouter une souche de

TABLEAU I.

	NOMBRE DE SOUCHES TESTÉES	NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES AUX DOSES SUIVANTES DE RISTOCÉTINE (EN MICROGRAMMES/ML.)					
		50	20	10	5	1	0,1
Méningocoque.....	4	0	—	—	—	—	—
Gonocoque.....	4	0	—	—	—	—	—
Dipl. pneumoniae.....	10	—	—	—	9	1	—
Strept. bêta-hémolytique.....	20	—	—	—	17	3	—
Strept. alpha-hémolytique.....	15	—	—	—	14	1	—
Entérocoque.....	20	—	—	—	20	—	—
Staphylocoque doré.....	40	—	—	7	32	1	—
Staphylocoque blanc.....	10	—	2	1	6	1	—
Salmonella typhi.....	4	0	—	—	—	—	—
Salmonella paratyphi B.....	4	0	—	—	—	—	—
Shigella flexneri.....	2	0	—	—	—	—	—
Shigella sonnei.....	2	0	—	—	—	—	—
Escherichia coli.....	4	0	—	—	—	—	—
Klebsiella.....	4	0	—	—	—	—	—
Serratia.....	4	0	—	—	—	—	—
Proteus.....	4	0	—	—	—	—	—
B. anitratum (M. glucidolytica).....	4	—	—	1	—	—	—
Pseudomonas.....	4	0	—	—	—	—	—
Listeria monocytogenes.....	8	—	—	—	8	—	—
Total des souches.....	167						

Bordetella bronchiseptica résistante à 50 $\mu\text{g/ml}$ et une souche de *Bacteridium anthracis* sensible à 5 $\mu\text{g/ml}$.

Toutes les souches de germes Gram-négatifs (cocci et bacilles) sont résistante, sauf une souche de *Bacterium anitratum*. Cette souche était

d'ailleurs particulièrement sensible à la majorité des autres antibiotiques.

A part la souche de bactérie charbonneuse, nous avons seulement introduit dans cette étude un seul genre de bacille Gram-positif, soit 8 souches de *Listeria*, dont 6 isolées chez l'homme (méningites et endocardite). Les 8 souches sont inhibées par 5 µg/ml de ristocétine, comme les 20 souches d'entérocoques.

Les pneumocoques et les diverses catégories de streptocoques sont toutes sensibles à 5 µg/ml ou même moins, alors que les staphylocoques se présentent de façon moins homogène (10 souches sur 50 résistent à 5 µg/ml).

Cette technique ne permettait pas d'étudier le comportement de germes vivant en anaérobiose stricte. Pour ceux-là on peut utiliser la méthode de diffusion en gélose, avec les disques de papier imprégnés d'antibiotique. Nous avons pratiqué cette méthode avec trois souches de *Welchia perfringens*. Les disques de 10 mm de diamètre avaient été immergés dans une solution de ristocétine à 1 mg/ml, puis séchés. Dans les trois cas les diamètres d'inhibition en vingt-quatre et quarante-huit heures étaient de 25 à 30 mm.

L'ensemble de nos résultats concorde avec ceux des autres auteurs [1-4]. En particulier Schneierson et ses collaborateurs ont signalé l'étalement de la sensibilité des diverses souches de staphylocoques qu'ils ont testés.

RÉSUMÉ. — La recherche du pouvoir bactériostatique de la ristocétine vis-à-vis de 169 souches microbiennes diverses confirme l'action de cet antibiotique sur les germes Gram-positifs, et tout spécialement parmi eux, les streptocoques, les entérocoques et les *Listeria*. Pratiquement, il n'a aucune action sur les germes Gram-négatifs, même les *Neisseria*.

SUMMARY

SENSITIVITY OF CERTAIN BACTERIAL STRAINS TO RISTOCETIN.

Study of 169 strains belonging to various genera and species. The antibiotic is active on Gram-positive germs, particularly on streptococci, enterococci and *Listeria*. It has no activity on Gram-negative bacteria, even on *Neisseria*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRUNDY (W. E.), SINCLAIR (A. C.), THÉRIAULT (R. J.), GOLDSTEIN (A. W.), RICKIER (C. J.), WARREN (H. B. Jr), OLIVER (T. J.) et SYLVESTER (J. C.). *Antibiotics Annual*, 1956-1957, *Med. Encycloedia*, New-York, 1957, 687-692.
- [2] GANGAROSA (E. J.), LANDERMAN (N. S.), ROSCH (P. J.) et HERNIDON (E. G.) *New England J. Med.*, 1958, **259**, 156-161.
- [3] ROMANSKY (M. J.), LIMSON (B. M.) et HAWKINS (J. E.). *Antibiotics Annual*, 1956-1957, *Medical Encyclopedia*, New-York, 1957, 706-715.
- [4] SCHNEIERSON (S. S.), AMSTERDAM (D.) et BRYER (M. S.). *Antibiot. Chemother.*, 1958, **8**, 204-207.

**NOUVELLE MÉTHODE DE SÉRODIAGNOSTIC
DE LA SYPHILIS *IN VIVO*,
OU PHÉNOMÈNE DE PFEIFFER
APPLIQUÉ A *TREPONEMA PALLIDUM***

par A. VAISMAN et A. HAMELIN.

(Institut Alfred-Fournier, Paris)

En 1955, Tani, Matsubara et Hayashi [1] ayant rencontré des difficultés dans la préparation des suspensions de tréponèmes pour le test de Nelson [2] ont cherché à remplacer la réaction *in vitro* par une méthode *in vivo* ne nécessitant pas de suspensions de tréponèmes parfaitement mobiles comme l'exige le test d'immobilisation. Les auteurs ont employé la cavité péritonéale du cobaye pour observer l'inhibition de mobilité des spirochètes en présence d'anticorps syphilitique, en remplacement des manipulations compliquées qu'implique le test *in vitro*. Il s'agit, en résumé, d'un T. P. I. *in vivo* chez le cobaye.

Leur technique consiste à injecter dans le péritoine d'un cobaye neuf 1 ml d'une suspension de tréponèmes fraîchement préparée, mélangée à 1 ml de sérum inactivé à examiner. Le cobaye est ponctionné après trente minutes, une heure, deux heures, trois heures, quatre heures et vingt-quatre heures et le liquide est examiné à l'ultramicroscope. Les sérums syphilitiques entraînent une immobilisation des tréponèmes, puis une diminution du nombre des parasites dans les quatre premières heures, enfin une disparition totale, en moins de vingt-quatre heures. Les sérums normaux ne donnent ni immobilisation, ni diminution appréciable du nombre des spirochètes dans les quatre premières heures.

Il nous a semblé intéressant de vérifier cette méthode pour l'intérêt théorique qu'elle présente, et surtout de voir si elle pouvait être appliquée pour les sérums qui donnent des tests de Nelson non satisfaisants. De tels sérums provoquent une immobilisation des tréponèmes dans le tube témoin sans complément, donc immobilisation non spécifique due à une toxicité du sérum, traces d'antibiotiques ou autres médicaments tréponémicides dans le sang, ou mauvaises conditions de prélèvement.

Après avoir reproduit les expériences de ces auteurs, nous en avons quelque peu modifié la technique et nous l'avons appliquée à l'étude de 106 sérums et liquides céphalo-rachidiens.

TECHNIQUE. — On prépare une suspension de tréponèmes pâles dans l'eau physiologique correspondant environ à 100 millions d'organismes par millilitre. Cette suspension peut être indifféremment utilisée le jour même ou le lendemain. A 1 ml du sérum inactivé à examiner,

on ajoute 4 ml de la suspension antigénique et après trente minutes de contact à 37° C, le mélange est injecté dans le péritoine d'un cobaye.

Nous effectuons deux lectures du liquide péritonéal à l'ultramicroscope en comptant les tréponèmes dans 50 champ : la première, quatre heures après l'injection, la seconde sept heures après. Ces deux lectures donnent des résultats pratiquement identiques et ont surtout pour but de se contrôler, apportant une confirmation du résultat obtenu déjà après quatre heures.

On constate, dans les réactions négatives, la présence d'un nombre de tréponèmes dans le liquide péritonéal variable avec chaque cobaye et ce nombre est suffisamment élevé pour permettre une lecture facile. Mais, fait très important, pour chaque cobaye négatif, les deux lectures après quatre et sept heures sont identiques, et ceci élimine pratiquement toute erreur d'interprétation.

Dans les réactions positives, en général, on ne retrouve plus de tréponèmes dans le liquide de la ponction de quatre heures ; dans les cas où il persiste encore quelques rares tréponèmes, ceux-ci ont disparu à la septième heure, moment de la seconde lecture.

RÉSULTATS. — Les 106 sérums et liquides céphalo-rachidiens que nous avons examinés se répartissent comme suit :

a) 39 sérums négatifs à la sérologie classique et au T. P. I., provenant de sujets exempts de syphilis. Tous ces sérums ont donné sur le cobaye un test négatif.

b) 46 sérums ou liquides céphalo-rachidiens positifs au T. P. I. comme à la sérologie classique, provenant de spécifiques connus, traités ou non, ont tous donné un test nettement positif sur le cobaye, c'est-à-dire disparition totale des tréponèmes à la quatrième ou septième heure.

c) 7 sérums ont fourni des résultats moins nets, et nous reviendrons sur ces cas dans un travail ultérieur.

d) 5 sérums faussement positifs à la sérologie classique et à T. P. I. négatifs bien entendu, ont fourni sur le cobaye des résultats également négatifs.

e) 1 sérum de syphilis primaire, positif à la sérologie classique, mais à T. P. I. à peine douteux, a donné un test sur cobaye négatif.

f) 4 sérums de spécifiques connus, à sérologie classique positive, mais dont les tests de Nelson ont été non satisfaisants, soit en raison d'un traitement en cours du malade, soit de mauvaises conditions de prélèvements, ont présenté des tests nettement positifs chez le cobaye.

g) 4 sérums négatifs en sérologie lipidique, provenant de sujets sans syphilis connue, dont le test de Nelson s'est révélé non satisfaisant, probablement en raison des conditions de prélèvement, ont fourni des tests sur cobayes absolument négatifs.

Dans le tableau I, nous donnons les résultats et observations des sérums inclus dans les paragraphes d), e), f) et g).

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Cette nouvelle réaction proposée par Tani et ses collaborateurs, rentre dans le groupe des réactions spécifiques du séro-diagnostic de la syphilis, du fait qu'elle emploie comme antigène le tréponème pâle lui-même.

Cobayes N°	Sérums N°	Sérologie lipidique	Test de Nelson	Résultats donnés par le test sur cobaye		Observations
				Nombre moyen de tréponèmes par champ microscopique		
				après 4 h.	après 7 h.	
71	79.700	+++	11%	5	5	Sérologie lipidique faussement positive (déjà constatée en 1957 et 1958)
81	68.480	+++	8%	3	4	Fausse positivité déjà constatée en 1953, 55 et 56
92	80.153	++	7%	4	3	Fausse positivité constatée en 1957 et 58.
96	80.377	++	2%	5	6	Faux positif.
103	80.048	+++	4%	5	6	Faux positif, femme enceinte.
77	79.733	++	22%	6	5	Syphilis primaire (le test sur cobaye est, comme le T.P.I., moins précoce que la sérologie classique).
70	79.711	+++.	N.S.*	0	0	Syphilis connue et traitée.
79	79.915	+++	N.S.	0	0	Syphilis en traitement.
86	80.193	+++	N.S.	0	0	aortite syphilitique traitée.
94	80.389	+++.	N.S.	moins de 1	0	Syphilis ancienne.
72	80.042	—	N.S.	8	8	pas de syphilis connue.
95	80.394	—	N.S.	7	8	idem
100	80.497	—	N.S.	3	4	idem
101	80.504	—	N.S.	4	3	idem

* N. S. Test non satisfaisant, c'est-à-dire tréponèmes immobilisés dans le tube témoin-sérum, sans complément. Les immobilisations n'agissent qu'en présence de complément, on ne peut donc pas juger si un tel sérum contient ou non l'anticorps spécifique.

Elle possède sur le test d'immobilisation un certain nombre d'avantages, à savoir :

1° Inutilité du milieu de survie de Nelson, complexe de préparation, puisque la suspension antigénique se fait dans l'eau physiologique.

2° Possibilité d'utiliser des suspensions de tréponèmes indifféremment mobiles ou non mobiles, fraîchement préparées ou conservées, voire même des tréponèmes tués. Nous avons travaillé avec des suspensions fraîches ou bien préparées la veille, les résultats étant absolument identiques. Nous avons même utilisé dans un essai des tréponèmes tués par trente minutes de chauffage à 56° C, avec un résultat satisfaisant, quoique légèrement moins net qu'avec des suspensions non chauffées. Nous n'avons pas encore déterminé les conditions précises de conservation de la suspension antigénique, étude qui sera complétée ultérieurement.

3° Il n'est pas indispensable d'opérer, comme pour le T. P. I., dans des conditions rigoureuses de stérilité.

4° Il nous semble que l'avantage le plus important est la possibilité d'avoir des résultats valables pour des sérums qui donnent au T. P. I. une réponse non interprétable, soit du fait de la présence de traces d'antibiotiques ou autres médicaments tréponémicides, soit en raison des prélèvements défectueux.

Par contre, ses inconvénients sont :

1° Nécessité d'un grand nombre de spirochètes pour chaque réaction, puisqu'il faut utiliser plusieurs millilitres de suspension antigène pour chaque sérum ;

2° Besoin d'au moins un cobaye par réaction.

3° Difficulté d'application d'un tel test pour des grandes séries de sérums, ce qui est plus facilement réalisable avec le T. P. I.

Par rapport aux autres réactions utilisant les antigènes tréponémiques, pour lesquelles, dans l'ensemble, les réagines sont plus ou moins gênantes, le test de Tani ne semble pas, tout au moins d'après nos premiers essais, être influencé par la présence de réagines. On sait que la majorité des auteurs conseillent d'éliminer par adsorption lipidique ces réagines avant de pratiquer les réactions d'agglutination [3] ou d'immune-adhérence [4] par exemple.

Il apparaîtrait donc que le test sur cobaye (phénomène de Pfeiffer appliqué *Treponema pallidum*) soit aussi spécifique que le test de Nelson.

Quant à la sensibilité, il nous semble, d'après notre première étude, qu'elle soit un peu inférieure à celle du T. P. I. auquel nous l'avons comparé.

RÉSUMÉ. — Tani, Mastubara et Hayashi ont appliqué le phénomène de Pfeiffer au tréponème pâle pour le séro-diagnostic de la syphilis, en remplacement du test d'immobilisation de Nelson et Mayer *in vitro*. Il s'agit en résumé d'un T. P. I. *in vivo* chez le cobaye.

Vaisman et Hamelin ont appliqué cette nouvelle technique quelque peu modifiée, à l'étude de 106 sérums et liquides céphalo-rachidiens humains. Leurs résultats sont encourageants, se rapprochant de ceux

du T. P. I., mais l'intérêt de ce test *in vivo*, qui ne peut pas être facilement appliqué en série, leur semble concerner surtout les sérums qui donnent des résultats non interprétables au T. P. I.

SUMMARY

A NEW METHOD OF *in vivo* SERODIAGNOSTIC IN SYPHILIS,
OR APPLICATION OF PFEIFFER'S PHENOMENON TO *Treponema pallidum*.

Tani, Matsubara and Hayashi have applied the Pfeiffer's phenomenon to *Treponema pallidum* for the serodiagnostic in syphilis, with a view to replace the Nelson test. The technique can be considered as an *in vivo* Nelson test in guinea pigs.

Vaisman and Hamelin, by means of this slightly modified technique, have studied 106 human sera and spinal fluids. Their findings are encouraging ; but this *in vivo* test cannot be easily carried out serially ; it should be reserved to sera giving a dubious Nelson test.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TANI (T.), MATSUBARA (M.) et TAYASHI (T.). *Jap. J. med. Sci.*, 1955, **8**, 303.
- [2] NELSON (R. A.) et MAYER (M. M.). *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369.
- [3] McLEOD (Ch. P.) et STOKES (P. S.). *Publ. Hlth Rep.*, 1955, **70**, 379.
- [4] REIN (Ch. R.) et KELCEG (L. C.). *Am. J. clin. Path.*, 1957, **28**, 417.

REMARQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET BACTÉRIOLOGIQUES SUR UNE ÉPIDÉMIE DE GASTRO-ENTÉRITES INFANTILES ASSOCIÉES A *ESCHERICHIA COLI* O127 B8

par M. VIARRE, B. GAUDIER et R. BUTTIAUX.

(Institut Pasteur de Lille)

Taylor [1] a déjà signalé un phénomène épidémiologique curieux constaté en Angleterre : un sérotype d'*E. coli* G. E. I. dominant par sa fréquence et son action pathogène depuis longtemps devient rapidement plus rare ou disparaît presque totalement ; il est alors remplacé par un autre sérotype aussi ou plus fréquent et virulent que son prédécesseur.

Nous venons de constater ce processus de remplacement dans notre région du Nord de la France. Nous avons insisté précédemment [2] sur le rôle prédominant joué chez nous par O111, O55 étant responsable de rares petites épidémies intra-hospitalières et O26 se rencontrant seulement dans quelques cas sporadiques. O127 : B8 signalé aux U. S. A.

par Ewing [3] et Cooper [4] n'était associé, en France, qu'à un nombre excessivement faible de gastro-entérites infantiles. Dès juillet 1958 pourtant, nous l'isolons quinze fois plus qu'auparavant, et trois mois plus tard il détermine une véritable poussée épidémique. Plus sa fréquence augmente, plus celle du O111 diminue. Ce dernier semble, à ce moment, avoir un rôle aussi effacé que celui des autres sérotypes O55 et O26. Ce curieux balancement est parfaitement décelable dans le tableau I. La suprématie de O127 est passagère pourtant et les premiers résultats des examens systématiques du début de 1959 montrent le phénomène inverse : O111 remplace progressivement O127.

TABLEAU I.

Année 1958	Janvier Février Mars	Avril Mai Juin	Juillet Août Septembre	Octobre Novembre Décembre
Nombre total d' <u>E.coli</u> G.E.I. isolés	114	149	159	155
O111:B4	98	140	92	24
O127:B8	3	4	55	111
Sérotypes divers	13	5	12	20

REMARQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET CLINIQUES. — Profitant des possibilités que nous donne l'étendue de la région où nous sommes appelés à pratiquer les examens bactériologiques des selles des nourrissons atteints de gastro-entérite, nous avons essayé de déterminer si la première extension du O127 provenait d'un foyer isolé. Les renseignements recueillis montrent que le sérotype s'est manifesté en réalité à deux jours d'intervalle dans deux villes distantes de 30 km, avant l'apparition des contaminations hospitalières. En quatre mois, il était généralisé dans une région ayant une superficie de plus de 1 000 km² sans qu'il soit possible de déceler le vecteur de l'épidémie. Ce caractère très particulier oppose nettement l'aspect épidémiologique des gastro-entérites infantiles associées à des *E. coli* à celui des infections intestinales produites par les *Salmonella* et les *Shigella*. Il est peu favorable à l'hypothèse d'une transmission par des aliments contaminés. Il nous a été impossible, d'ailleurs, d'isoler O127 dans les laits distribués aux nourrissons infectés, dans quelques-uns des services hospitaliers où cette recherche a pu être entreprise.

Dans tous les services hospitaliers où ce sérotype a été introduit, la contamination a été rapide et massive ; elle a été particulièrement généralisée dans les services de prématurés malgré les précautions prises pour l'éviter. Comme pour O111, les sujets de moins d'1 an sont principalement touchés et l'infection est favorisée par les mêmes facteurs : débilité générale ou tares et prématuration. Du point de vue clinique, on note : 1° Le nombre restreint des états toxémiques ; il

peut s'expliquer par l'institution très rapide d'une antibiothérapie active. 2° Le nombre cependant élevé de diarrhées sévères avec déshydratation. Cet aspect grave de la maladie survient dans 50 p. 100 des cas. 3° La mortalité est faible ; elle n'a pas dépassé 2 p. 100 ; elle est survenue exclusivement chez les prématurés ou les enfants présentant par ailleurs une cardiopathie congénitale, de l'hypotrophie ou des broncho-pneumonies.

La thérapeutique utilisée a fait un large appel aux antibiotiques. 95 p. 100 des souches isolées étaient résistantes au chloramphénicol ; 50 p. 100 étaient sensibles aux tétracyclines (chlortétracycline, oxytétracycline et tétracycline) et à la néomycine ; toutes étaient sensibles à la colimycine et à la furadoïne. L'emploi de la néomycine et surtout de la colimycine a produit une amélioration rapide des symptômes cliniques. O127 a disparu des selles des malades en trois à sept jours. Nous n'avons pas pu dépister de porteurs chroniques.

REMARQUES BACTÉRIOLOGIQUES. — 1° *Caractères biochimiques des souches isolées.* Sur les 166 souches trouvées de juillet à décembre 1958, 98 isolées à des dates différentes et dans des foyers distincts ont été soumises à un examen détaillé pour dépister l'éventualité de biotypes chez le sérotype. Toutes sont immobiles : ce caractère avait déjà été signalé par Ewing [3] et Cooper [4]. Quatre-vingt-dix des 98 souches étudiées ont d'autres caractères identiques. Toutes fermentent les lactose, glucose, mannitol en vingt-quatre heures avec production de gaz ; le rhamnose, l'arabinose, le xylose sont aussi fermentés en vingt-quatre heures ; le saccharose en quarante-huit heures avec seulement une bulle de gaz ; le maltose en quarante-huit heures ; le dulcitol en quatre jours et le raffinose en cinq jours. Par contre, l'adonitol, la salicine, l'inositol ne sont pas attaqués en trente jours à 37°. Le sorbitol est fermenté par 52 des 90 souches en dix à quinze jours, les 38 restantes ne le transformant pas en trente jours.

La production d'indole est très faible. Elle disparaît assez rapidement chez les souches entretenues sur gélose de Felix [5] employée dans notre Service pour la conservation des *Enterobacteriaceae*.

Réaction au rouge de méthyle, positive. Réaction de Voges-Proskauer, négative. Le citrate de sodium n'est pas utilisé comme seule source de carbone. Pas d'urécolyse sur milieu de Christensen, pas de liquéfaction de la gélatine.

La seule propriété différentielle notable est donc l'absence de fermentation du sorbitol. Il semble prudent de n'en pas tenir compte pour la distinction de deux biotypes sorbitol +, sorbitol —, car leur répartition n'a apparemment aucun rapport précis, jusqu'à présent, avec les constatations épidémiologiques. Huit souches sur les 98 étudiées ont présenté des caractères aberrants (production abondante d'indole, absence de fermentation du saccharose, fermentation de la salicine et du raffinose en vingt-quatre heures) dont il est impossible de tenir compte en vue d'une tentative de classification. Dans les selles d'un nourrisson diarrhéique, nous avons rencontré, à côté d'un *E. coli* O127 fermentant rapidement le lactose, une variété lactose + lent. Elle possède une structure antigénique rigoureusement analogue à celle de la forme lactose + ; elle est agglutinée au même taux que cette dernière

dans l'antisérum O127 : B8 (antigènes O et K). Tous les caractères biochimiques sont identiques ; il en est de même pour la sensibilité des deux formes aux antibiotiques. Les colonies lactose — présentent au bout de dix jours d'incubation à 37° des papilles lactose +. En milieu liquide, le sucre est fermenté en vingt jours seulement. L'existence de ces variétés pose un problème difficile dont il ne faut pas sous-estimer l'importance ; nous les avons retrouvées, en effet, dans les selles de cinq autres nourrissons en l'absence de toute forme lactose +. Elles doivent donc être recherchées avec attention.

2° *Formes antigéniques dégradées.* Lors du premier examen de selles, les O127 agglutinaient aux titres O et B dans les anti-sérums homologues. Il n'en fut plus toujours ainsi pour les souches isolées dans les examens ultérieurs chez les sujets traités par les antibiotiques, et en particulier la colimycine. Les taux d'agglutination B et O diminuent alors notablement ; pour B, il tombe de 1/640 à 1/160 ; pour O de 1/2520 à 1/640 ou 1/320 avec le sérum que nous possédons. Ces souches dégradées ont les mêmes caractères biochimiques que les souches typiques. Elles récupèrent souvent leurs caractères sérologiques après plusieurs passages successifs sur gélose glucosée à 1 p. 1 000 ; dans ce cas, l'agglutination des antigènes O et B augmente simultanément. Ce phénomène est intéressant ; tout se passe, en effet, comme si O et B étaient un seul et même antigène formé de deux fractions étroitement associées. Si ces deux antigènes avaient une position différente dans le corps bactérien, il est vraisemblable que des aspects variés de ce processus de dégradation pourraient survenir : B déficient, par exemple et O restant intact. Cette dégradation antigénique est importante en pratique. Elle infirme les règles prescrites pour l'identification des sérotypes des *E. coli* G. E. I. ; après l'absorption de certains antibiotiques, il semble nécessaire de ne pas négliger *a priori* les formes n'agglutinant pas dans les antisérums aux titres définis pour chacun de ceux-ci. Il est inutile de rappeler, pourtant, que ces phénomènes doivent être interprétés avec la plus extrême prudence et que, dans les cas douteux, des épreuves de saturation sont indispensables.

RÉSUMÉ. — Au cours de l'année 1958, le sérotype O127 : B8 des *E. coli* associés aux gastro-entérites infantiles est devenu rapidement prédominant chez les nourrissons de la région du Nord de la France atteints de cette maladie. Il a progressivement remplacé O111 : B4 antérieurement le plus fréquent. Des foyers épidémiques sont survenus en même temps dans des localités séparées les unes des autres par de longues distances. La diffusion de ce sérotype est rapide dans les services hospitaliers. Son pouvoir pathogène est comparable à celui de O111 ; il produit 50 p. 100 de formes cliniques sévères avec déshydratation. L'administration précoce d'antibiotiques actifs guérit rapidement les malades et fait disparaître en même temps le germe des selles. La mortalité est faible (2 p. 100) et survient surtout chez les prématurés ou chez les nourrissons présentant des malformations ou des infections connexes.

Toutes les souches isolées au cours de l'épidémie sont immobiles. Il est impossible de définir avec certitude des biotypes différents. La production d'indole est faible et tardive. Des variétés lactose + lent

sont relativement fréquentes et doivent donc être systématiquement recherchées. Certaines formes antigéniquement dégradées peuvent apparaître au cours de l'antibiothérapie avec la colimycine surtout. Elles récupèrent en général la totalité de leurs propriétés par passages successifs sur gélose glucosée à 1 p. 1 000.

SUMMARY

EPIDEMIOLOGICAL AND BACTERIOLOGICAL CONSIDERATIONS
ON AN INFANTILE GASTRO-EPIDEMIC FROM WHICH *E. coli* O127 WAS ISOLATED.

In 1958, the serotype O127 : B8 has become predominant in infants suffering from infantile gastro-enteritis. It has progressively replaced the O111 : B4 type, which until then was the most frequently found. Its pathogenicity is about the same as that of O111 ; it provokes 50 % of severe clinical forms. The disease is rapidly cured by an early administration of active antibiotics ; the diseased infants recover and the bacteria disappear from their stools. The mortality is low (2 %).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TAYLOR (J.). *Pathol. et Biol.*, 1958, **6**, 893.
- [2] BUTTIAUX (R.), NICOLLE (L.), LE MINOR (S.), LE MINOR (L.) et GAUDIER (B.). *Arch. Mal. App. digest.*, 195, **45**, 225.
- [3] EWING (W. H.), TANNER (K. E.) et TATUM (H. W.). *Publ. Hlth Rep.*, 1955, **70**, 107.
- [4] COOPER (M. L.), WALTERS (E. W.) et KELLER (H. M.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 689.
- [5] FELIX (A.). *J. Hyg.*, 1938, **38**, 759.

FAUSSE POSITIVITÉ DE LA RÉACTION DE WAALER-ROSE DANS LA MONONUCLÉOSE INFECTIEUSE

par J. SAOUT et G. DEMARET.

(Centre de Transfusion Sanguine de la 3^e Région Maritime, Toulon)

La réaction de Waaler-Rose, réalisée avec des globules rouges de mouton sensibilisés par un immunsérum de lapin, est positive dans 54,4 p. 100 des cas de polyarthrite chronique évolutive (1), selon Eyquem et coll., dans 75 p. 100 des cas selon J. Martin [4]. Ce dernier indique également que la « réaction positive a une valeur diagnostique certaine, si le sujet n'a pas une affection aiguë ou chronique (hépatite aiguë, tuberculose grave en évolution, myélome) perturbant profon-

(1) Lire désormais dans le texte : P. C. E.

dément le milieu intérieur ». Elle est positive dans 70 p. 100 des cas lorsqu'on utilise les globules rouges humains O sensibilisés par un immunosérum de lapin [2].

Nous avons cependant constaté, dans la pratique des examens immunologiques, l'existence de réactions de Waaler-Rose positives avec des sérums de sujets atteints de mononucléose infectieuse (2), fait surprenant au premier abord, puisque la réaction réalise dans un premier temps l'absorption des hétéro-agglutinines anti-mouton.

TECHNIQUE. — Nous avons effectué en parallèle les deux réactions sur :

Trois sérums de sujets atteints de P. C. E. (P_1 , P_2 , P_3) ;

Trois sérums de sujets atteints de M. I. (M_1 , M_2 , M_3).

Les techniques utilisées ont été :

1° La réaction de Waaler-Rose, pratiquée selon la méthode décrite par Martin et Fleury (action d'un sérum décomplémenté, privé de ses hétéro-agglutinines par contact d'une heure et demie à 37° avec un égal volume d'hématies de mouton) sur des globules rouges de mouton sensibilisés par un sérum hémolytique à dilution convenable. Un taux d'agglutination supérieur ou égal à 1/42 signe une réaction positive.

2° La réaction de Paul, Bunnell et Davidsohn sous sa forme classique.

Les résultats peuvent être simplement résumés comme suit :

	SÉRUMS					
	P_1	P_2	P_3	M_1	M_2	M
Réaction de Waaler-Rose	+	+	+	+	+	+
Réaction de Paul et Bunnell	0	0	0	+	+	+

Il existe donc, en apparence, une réaction croisée d'agglutination entre les deux affections, ou, plus exactement, tout se passe comme s'il y avait, dans la M. I., augmentation du taux de l'activateur responsable de l'agglutination des hématies sensibilisées.

Outre cette constatation, deux faits supplémentaires doivent être mentionnés :

a) L'absorption du sérum de M. I. par les hématies de mouton non sensibilisées, telle qu'elle est pratiquée dans la réaction de Waaler-Rose, ne négative pas la réaction de Paul et Bunnell : cette absorption a été suivie, dans nos essais, d'une chute du taux de l'anticorps d'une ou deux dilutions (3).

Par contre l'absorption du sérum de M. I. par un culot d'hématies sensibilisées par le sérum hémolytique pour la réaction de Waaler-Rose fait disparaître complètement les anticorps caractéristiques de la M. I.

(2) Lire désormais dans le texte : M. I.

(3) Dans la technique préconisée par Podliachouk, Eyquem et Jacqueline [5], pour la réaction de Waaler-Rose, l'absorption réalisée successivement sur deux culots d'hématies est plus complète, mais l'agglutination des hématies sensibilisées atteint un taux suffisant (de 1/28 à 1/112) pour que la réaction soit considérée comme positive.

b) La réaction faussement positive de Waaler-Rose dans la M. I. est dépistée par l'agglutination d'un des deux tubes témoins de la réaction : hématies de mouton non sensibilisées + sérum du malade.

DISCUSSION. — Cette fausse réaction de Waaler-Rose positive pourrait être interprétée :

1° Comme signant la présence d'un anticorps commun dans les deux types de sérum ; mais le sérum de P. C. E. n'agglutine pas les hématies de mouton utilisées dans la réaction de Paul et Bunnell.

2° Comme traduisant l'apparition, dans la M. I., de l'activateur caractéristique de la P. C. E. Mais les réactions de Waaler-Rose que nous avons effectuées sur deux sérums de M. I. en utilisant le système « hématies humaines + sérum anti-homme » se sont révélées négatives [5].

Il semble donc que l'explication de cette fausse positivité de la réaction de Waaler-Rose réside dans le faible pouvoir d'absorption des hématies de mouton pour les anticorps de la M. I. (la réaction de Paul et Bunnell elle-même demeure positive après une telle absorption (4) [4]).

En faveur de cette conception est la constatation que nous avons faite, dans un cas, de la positivation simultanée de deux réactions :

Malade B... :

Paul et Bunnell : agglutination au 1/20 le 5 avril ;

Waaler-Rose : négative le 5 avril ;

Paul et Bunnell : agglutination au 1/80 le 8 avril ;

Waaler-Rose : positive au 1/56 le 8 avril (témoin 2+).

Le taux des anticorps anti-hématies de mouton était sans doute assez bas le 5 avril pour permettre leur absorption quasi totale dans le premier temps de la réaction de Waaler-Rose.

INTÉRÊT DE CES CONSTATATIONS. — Il est double :

1° *Clinique* : On sait qu'il existe une forme fébrile pure de la mononucléose infectieuse avec myalgies et courbatures, qu'une autre forme se traduit par une angine retardée. Une réaction de Waaler-Rose demandée sur la constatation de douleurs plus ou moins précises, et faussement positive ne peut, dans ces cas, qu'accroître la difficulté du diagnostic [7].

2° *Immunologique* : La constatation d'une réaction de Waaler-Rose positive avec agglutination dans le tube témoin « hématies normales + sérum » doit inciter à pratiquer une réaction de Paul et Bunnell.

Connaissant l'affinité du virus de la M. I. pour le foie et la nécessité, démontrée par Laporte et coll. [6], d'une atteinte hépatique pour que la réaction de Paul et Bunnell soit positive, il est permis de penser que ces « faux Waaler-Rose » entrent dans le cadre des hépatites aiguës mentionnées au début de cet article, avec la réserve qu'elles n'ont pas d'expression clinique.

(4) Eyquem et coll. obtiennent une absorption totale, mais les conditions expérimentales sont différentes (2 volumes de purée globulaire, douze heures à + 4°).

Peut-être, en contre-partie, certaines des hépatites en cause avaient-elles pour agent le virus de la mononucléose ?

Quoi qu'il en soit, la possibilité de réactions « croisées » entre P. G. E. et M. I. nous paraît être un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation de la réaction d'agglutination avec hématies humaines O et sérum de lapin anti-homme : elle éliminera le facteur « antigène hématies de mouton » responsable.

RÉSUMÉ. — Le sérum de sujets atteints de mononucléose infectieuse, confirmée par la réaction de Paul et Bunnell, donne une réaction de Waaler-Rose positive, vraisemblablement en raison de la faible absorption des anticorps de la M. I. par les globules de mouton : d'où l'intérêt du témoin « hématies de mouton normales + sérum », dont l'agglutination signe une fausse positivité de la réaction.

L'utilisation du système « hématies humaines sensibilisées par un sérum anti-homme » doit éviter cette cause d'erreur.

SUMMARY

FALSE POSITIVE WAALER-ROSE REACTION IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS.

Sera of individuals suffering from infectious mononucleosis (confirmed by Paul and Bunnell reaction) show a positive Waaler-Rose reaction. This seems to be due to the weak absorption of anti-infectious mononucleosis antibodies by sheep erythrocytes. It is therefore necessary to carry out a control reaction : normal sheep erythrocytes + serum. This source of error can be eliminated by using a system « human erythrocytes sensitized by an anti-human serum ».

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MARTIN (J.) et FLEURY (M^{me}). *Méd. et Lab.*, 1957, **7**, 45.
 - [2] EYQUEM (A.), FRANÇO (J. C.), PODLIACHOUK (M^{me} L.) et JACQUELINE (F.). *Rev. Fr. Et. Clin. Biol. (sous presse)*.
 - [3] JOCHEM (E.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 625).
 - [4] EYQUEM (A.), JACQUELINE (F.) et JOCHEM (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 1956, 697).
 - [5] PODLIACHOUK (M^{me} L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, **94**, 659).
 - [6] LAPORTE (R.), HARDRE DE LOOZE (L.), LE MINOR (L.) et SILLARD [R.]. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**.
 - [7] BERNARD (Jean). *Maladies du Sang*. Flammarion, édit.
 - [8] EYQUEM (A.), FINE (J.), MAILLOUX (M.) et PODLIACHOUK (M^{me} L.). *Le Sang*, 1955, n° 7, 664.
-

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoires* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude d'une souche de *Flavobacterium*, agent d'une épizootie chez les carpes, par J. MEYER, J. MALGRAS, CH. ROMOND et C. BOEGLIN.

Etude comparée des méthodes de recherche des anticorps neutralisants par la technique habituelle et par celle d'immuno-inactivation de Gard avant et après injection de vaccin poliomyélitique inactivé, par R. SOHIER, Y. CHARDONNET et J. FREYDIER.

La réaction de fixation du complément au cours et au décours des infections à adénovirus, par R. SOHIER, Y. CHARDONNET et J. FREYDIER.

Culture de *Borrelia recurrentis* (souches éthiopiennes) en œuf fécondé de poule, par R. GUTFREUND.

Modification de la réceptivité des hématies animales et humaines aux agglutinines grippales et ourliennes après traitement de ces hématies par le formol, par B. FAUCONNIER.

Etude technique du dosage biologique de l'INH actif, dans les humeurs, par A. TACQUET et F. TISON.

Etude immuno-électrophorétique du facteur rhumatoïde, par J. C. FRANCO, A. EYQUEM, M^{me} L. PODLIACHOUK et F. JACQUELINE.

LIVRES REÇUS

Houben-Weyl. — *Methoden der organischen Chemie*, 4^e édition, par E. Müller, assisté de O. Bayer, H. Meerwein et K. Ziegler, tome XI/2 *Stickstoffverbindungen II* (suite) et *III*. 1 volume, 840 pages. Georg Thieme, édit., Stuttgart, 1958. Prix : DM : 155.

En rédigeant le volume XI se rapportant aux amines, les éditeurs se sont rendu compte de l'impossibilité de traiter en un seul volume, avec un développement suffisant, des méthodes de préparation et des propriétés des amines. Une division en deux parties XI/1 et XI/2 s'imposait.

Tandis que dans le volume XI/1 sont décrites les méthodes générales de préparation des amines, le volume XI/2 qui vient de paraître traite, tout d'abord, de la transformation des amines (222 pages) en d'autres groupements chimiques tels que carbonamides, amidines, nitramines, oxydes d'amine, ainsi que de la désamination par l'acide nitreux. Des chapitres spéciaux sont consacrés à la préparation et aux transformations des alcoylidène-imines-1,2 et 1,3 (47 pages), aux acides aminés (en particulier aux acides aminés naturels) et à leurs dérivés (242 pages),

aux lactames (76 pages), à la transformation des amines en sels d'ammoniums quaternaires (54 pages) ; enfin un dernier chapitre est consacré aux combinaisons renfermant du soufre et de l'azote, telles que les sulfamides (108 pages).

La bibliographie s'arrête vers le milieu de 1957 avec cependant des références du début de 1958.

Les auteurs se sont adressés, pour la rédaction de chaque chapitre, à des spécialistes de la question traitée, ce qui permet d'affirmer que la valeur de cet ouvrage égale celle des volumes précédemment parus et souligne son haut intérêt pratique et documentaire.

A. F.

Tokyo et Kyoto. — *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry*. 1 vol., 541 p. Pergamon Press, édit., Londres, 1957. Prix : £ 6.

Ce volume contient quatre conférences plénières et des communications portant sur le mécanisme des réactions de transfert enzymatique, du transport d'électrons et d'oxygène, sur la formation de protéines et d'enzymes et enfin sur les rapports de l'enzymologie et de l'industrie.

G. N. C.

J.-André Thomas. — *Problèmes d'organisation et de fonctions chez les bactéries et les virus*. 1 vol., 386 p. Masson, édit., Paris, 1958. Prix : 5 000 fr.

Ce quatrième volume des *Exposés actuels de biologie cellulaire* comprend les rapports suivants : Les éléments cytophysiologiques et l'organisation de la cellule bactérienne. Bases cytologiques d'une classification naturelle des bactéries, par A.-R. Prévot. Organisation des inframicrobes, rickettsiales, péripneumoniales, par P. Giroud et N. Dumas. Les cycles filtrants des bactéries et le cycle L des bactéries, par P. Hauduroy. Les acides nucléiques et les nucléoprotéines des bactéries : cycles biochimiques et physiologie, par R. Vendrely. Cristallographie et organisation des virus, par J. Barraud. Structure et fonctions des antigènes des virus, par Cl. Hannoun. Aspects de la reproduction des virus dans ses rapports avec les structures cellulaires, par P. Lépine.

L. L.

J. H. M. Jonxis et T. H. J. Huidman. — *A laboratory manual on abnormal haemoglobins*. 1 vol., 40 p., 11 fig. Blackwell Scientific Publications, Oxford, et Librairie Masson, Paris, 1958. Prix : 560 fr.

Ce petit manuel d'introduction à l'étude des hémoglobines anormales contient l'essentiel de ce que doivent connaître les biochimistes qui s'intéressent à ce problème. Après un court chapitre concernant les hémoglobines, sont exposées les techniques chimiques d'identification des différents types d'hémoglobines humaines, à l'aide de l'électrophorèse sur papier ou amidon et la chromatographie sur colonne de résine. Le dernier chapitre concerne l'aspect hématologique du problème.

A. E.

J. M. Alston et J. C. Broom. — *Leptospirosis in man and animals.*
1 vol., 367 p. E. et S. Livingstone, édit., Edimbourg et Londres,
1958. Prix : 40 shillings.

Cet ouvrage d'épidémiologie fait le point actuel de nos connaissances. La place des leptospiroses dans la pathologie générale croît chaque jour par la découverte de nouveaux sérotypes (39 sont actuellement bien connus), par la précision de nouveaux foyers géographiques, enfin par le nombre toujours plus grand d'espèces animales éventuellement parasitées.

L'historique rappelle l'individualisation, d'abord clinique puis bactériologique, des affections à leptospires, la découverte progressive de nouveaux sérotypes. Après une étude morphologique (fond noir, microscope électronique), l'auteur discute les différents critères pouvant servir de base à une classification rationnelle des leptospires et retient à cet effet les caractères antigéniques particulièrement stables ; la terminologie de sérotypes plutôt qu'espèces lui paraît préférable. Les principales exigences nutritives et le métabolisme des leptospires, leur structure immunochimique (où les données sont encore très fragmentaires), les conditions de survie en dehors de l'organisme, la sensibilité aux agents physiques, chimiques et antibiotiques sont envisagées.

L'auteur aborde ensuite la partie fondamentale de l'ouvrage essentiellement épidémiologique. Elle a trait tout d'abord aux modalités de l'infestation des réservoirs de virus et à la distribution des sérotypes. L'infection humaine est ensuite très largement détaillée, la contamination, les diverses incidences qui peuvent influencer le cours de l'infection, l'anatomie pathologique et le syndrome biologique. Mention particulière est faite des formes sévères de la leptospirose ictéro-hémorragique et des formes bénignes à *Lept. canicola*. Le diagnostic biologique, la thérapeutique (échec quasi total des antibiotiques), la prophylaxie de la maladie humaine sont ensuite étudiés. La partie vétérinaire mentionne surtout les principaux sérotypes isolés, la clinique, la thérapeutique et la prophylaxie pour les animaux domestiques et les singes. L'auteur termine par le bilan actuel des leptospiroses dans les pays du globe où le problème est le plus étudié.

Un tel ouvrage intéressera en premier lieu l'hygiéniste et le clinicien préoccupés de maladies infectieuses, mais aussi tous ceux qui, sous quelque angle que ce soit, s'intéressent aux leptospires et veulent saisir l'ampleur d'un problème encore très mouvant. J. P.

Ciba Foundation Symposium on the biosynthesis of terpenes and sterols. 1 vol., 311 p., 102 fig. J. et A. Churchill Ltd, édit., 1959.
Prix : 45 shillings.

Ce Symposium, comprenant 20 articles d'auteurs différents, est une excellente mise à jour de la biosynthèse des terpènes et des stérols : on sait que la récente découverte de l'acide mévalonique comme précurseur des unités isoprènes a permis un grand pas dans la biosynthèse des terpènes et des stérols, qui sont eux-mêmes des polyisoprènes repliés. Dans cet ouvrage on trouvera les dernières informations sur les différentes étapes de la biosynthèse des stérols : acide acétique, acide

mévalonique, isoprène, squalène, cholestérol, acides biliaires. Quelques articles sont également consacrés à la biosynthèse des stérols des levures, à la biogenèse des terpénoïdes chez les champignons et des terpènes chez les moisissures et les plantes supérieures. Enfin un article concerne la biosynthèse des caroténoïdes par les microorganismes et en particulier par *Neurospora*.
F. B.

Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, publiés par H. HABS et J. KATHE. N° 12 : *Die Treponemen der Mundhöhle und ihre Bedeutung für die Pathogenese der oralen Fusospirochätosen*, par U. BERGER. 1 vol., 138 p., 35 fig. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1958.

L'auteur dresse l'histoire de l'isolement des différentes espèces de spirochètes buccaux et rappelle l'évolution des idées sur l'association fusospirillaire et le rôle primordial de la symbiose des différents anaérobies dans la pathogénie des infections buccales. La contribution apportée par Berger se situe dans l'étude de 12 souches de tréponèmes isolées en culture pure à partir de lésions buccales. Cette étude porte sur :

a) Les conditions de culture *in vitro* (milieu solide au départ, milieu semi-solide, milieu liquide), en présence toujours de substances réductrices et de liquide d'ascite.

b) La morphologie (fond noir, coloration, microscope électronique).

c) Les propriétés fermentaires à prédominance nettement protéolytiques.

d) L'absence de pouvoir pathogène chez l'embryon de poulet, l'animal adulte et même l'homme.

e) La sensibilité aux agents chimiques, antibiotiques et enzymatiques (insensibilité au lysozyme, notamment à des concentrations très supérieures à la concentration salivaire, sensibilité à la lipase).

f) L'étude des phénomènes immunitaires (phagocytose, facteurs sériques).

L'expérimentation inclut le plus souvent comme élément témoin la souche Reiter. L'auteur discute, en concluant, le rôle pathogène de telles souches qu'il estime par lui-même insuffisant.
J. P.

R. Richterich. — *Enzymopathologie. Enzyme in Klinik und Forschung*. 1 vol., XV + 703 p., 132 fig. Springer Verlag, Berlin, 1958. Prix : DM 128.

Ce volume, présenté par Gsell, après un exposé sur la sérologie des enzymes, passe en revue tous les troubles enzymatiques, en relation notamment avec les hormones, les processus cancéreux, la protéolyse, la fibrinolyse, la coagulation. L'équipement enzymatique des différents organes fait l'objet de chapitres successifs : tissu conjonctif, squelette, cœur, estomac, pancréas, foie, rein, prostate.

L'ouvrage est complété par un index des matières de 23 pages. Il constitue donc une mise au point précieuse.
A. E.

THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Editors : B. C. J. G. KNIGHT and A. F. B. STANDFAST

Contents of Vol. 20, No. 2, April 1959.

- ROSE, A. H. et MARTIN, S. M. Studies on a toxin-inactivating substance excreted by *Penicillium cyaneo-fulvum*.
- PROKOPIEVA-BELGOVSKAYA, A. et POPOVA, L. The influence of phosphorus on the development of *Streptomyces aureofaciens* and on its ability to produce chlor-tetracyclin.
- ENLAR, O. R. JUN. et SCHMIDT, E. L. A survey of heterotrophic micro-organisms from soil for ability to form nitrite and nitrate.
- MUHAMMED, A., RODGERS, A. et HUGHES, D. E. Purification and properties of a polymetaphosphatase from *Corynebacterium xerosis*.
- EDWARDS, M. R., HAZEN, E. L. et EDWARDS, G. A. The fine structure of the yeast-like cells of *Histoplasma* in culture.
- LINDEGREN, C. C., LINDEGREN, G. et DESBOROUGH, S. Gene controlled resistance against sensitivity to caffeine and nicotine in *Saccharomyces*.
- HAYWARD, A. C., FORSYTH, W. G. C. et ROBERTS, J. B. Synthesis and breakdown of poly- β -hydroxy-butyric acid by bacteria.
- WEIBULL, C., BECKMAN, H. et BERGSTRÖM, L. Localisation of enzymes in *Bacillus megaterium*, strain M.
- BROWN, A. M. Growth idiosyncrasies of some *Bordetella pertussis* strains, and the intracerebral virulence of these strains in mice.
- ROBERTS, C. F. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*).
- CLARKE, R. T. J. A dextran fermenting organism from the rumen closely resembling *Lactobacillus bifidus*.
- WRIGHT, D. E. The formation of keto and amino acids by *Mycobacterium butyricum* growing in a chemically defined medium.
- MORRIS, J. G., HUGHES, D. T. D. et MULDER, C. Observations on the assay of vitamin B₆ with *Saccharomyces carlsbergensis* 4228.
- MORRIS, J. G. et WOODS, D. D. Inter-relationships of serine, glycine and vitamin B₆ in the growth of mutants of *Escherichia coli*.
- MORRIS, J. G. The synthesis of vitamin B₆ by some mutant strains of *Escherichia coli*.
- DAVIDSON, F. F. Effects of blue-green algae extracts on pigment production by *Serratia marcescens*.
- KAPLAN, C. et VALENTINE, R. C. The infectivity of purified preparations of vaccinia and cowpox viruses.
- ROUNTREE, P. M. Changes in the phage typing patterns of staphylococci following lysogenization.
- ASHESHOV, E. H. et RIPPON, J. E. Changes in typing pattern of phage-type 80 staphylococci.
- RYAN, F. J. et KIRITANI, K. Effect of temperature on natural mutation in *Escherichia coli*.
- SMITH, E. E. B., MILLS, G. T., BERNHEIMER, H. P. et AUSTRIAN, R. A study of some enzymes in extracts of a non-capsulated strain of pneumococcus concerned with uridine pyrophosphoglycosyl metabolism.
- STOCKER, B. A. D. et CAMPBELL, J. C. Removal of flagella from bacteria by non-lethal methods; effects on motility; flagellar regeneration.
- McKEE, R. K. Factors affecting the toxicity of solanine and related alkaloids to *Fusarium caeruleum*.
- LEV, M. The growth promoting activity of compounds of the vitamin K group and analogues for a rumen strain of *Fusiformis nigrescens*.
- KASSANIS, B. Comparison of the early stages of infection by tobacco mosaic virus and its nucleic acid.

The subscription rate is 90s. net per volume of 3 parts.
Single parts 35s. each, plus postage. Two volumes will be
issued each year. Orders should be sent to

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS
BENTLEY HOUSE, 200 EUSTON ROAD, LONDON, N.W. 1

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1959. — 3^e trimestre. — Numéro d'ordre 3215. — Masson et C^{ie}, édit., Paris.
Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 4, rue Cassette, Paris.